

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I  
Prof. Dr. Martina Müller-Schilling  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**MODULATION DER IMMUNANTWORT VON  
COLON LAMINA PROPRIA FIBROBLASTEN  
BEI MORBUS CROHN DURCH INTERLEUKIN-33**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von  
Margareta Manka**

**2013**



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I  
Prof. Dr. Martina Müller-Schilling  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**MODULATION DER IMMUNANTWORT VON  
COLON LAMINA PROPRIA FIBROBLASTEN  
BEI MORBUS CROHN DURCH INTERLEUKIN-33**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von  
Margareta Manka**

**2013**

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Florian Obermeier

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Fichtner-Feigl

Tag der mündlichen Prüfung:

11.06.2013

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Aufbau des Gastrointestinaltrakts .....	1
1.2	Morbus Crohn .....	3
1.2.1	Epidemiologie .....	3
1.2.2	Morphologie .....	3
1.2.3	Ätiologie und Pathogenese .....	5
1.2.4	Klinik .....	7
1.2.5	Komplikationen .....	8
1.2.6	Diagnostik .....	8
1.2.7	Therapie .....	9
1.3	Zytokine .....	11
1.3.1	Interleukin-6 .....	12
1.3.2	Interleukin-8 .....	16
1.3.3	Interleukin-33 .....	18
1.4	CpG-ODN .....	23
1.5	p-ERK 42/44 sowie NF- $\kappa$ B p65 .....	24
1.6	Intestinale Fibroblasten .....	25
2	Materialien .....	29
2.1	Chemikalien und Reagenzien .....	29
2.2	Puffer und Lösungen .....	30
2.3	Antikörper .....	31
2.4	Stimulanzien .....	32
2.5	Verbrauchsmaterialien .....	32
2.6	Geräte .....	33
2.7	Software .....	35
3	Methoden .....	36
3.1	Zellexperimentelle Methoden .....	36
3.2	Versuchsplanung .....	39
3.2.1	Untersuchung der Zytokinantwort nach Stimulation .....	39
3.2.2	Stimulationsversuch .....	39

3.3	Western Blot.....	42
3.3.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	42
3.3.2	Nass-Transfer.....	43
3.3.3	Immunologischer Nachweis von Proteinen .....	44
3.3.4	Stripping .....	45
3.3.5	$\beta$ -Actin-Ladungskontrolle .....	45
3.4	Enzyme-linked immunosorbent assay .....	46
3.4.1	Allgemeines Prinzip.....	46
3.4.2	Bestimmung von Interleukin-6 und Interleukin-8.....	46
3.5	Statistik.....	47
4	Ergebnisse .....	49
4.1	Ziele.....	49
4.2	Morphologische Unterschiede der CLPF .....	50
4.3	Charakterisierung der Stimulierbarkeit von CLPF bezüglich verschiedener TLR-Liganden und TNF .....	51
4.3.1	Stimulation von KO-, MC- und MCS-CLPF mit TNF .....	51
4.3.2	Stimulation von KO-, MC- und MCS-CLPF mit LPS .....	53
4.3.3	Stimulation von KO-, MC- und MCS-CLPF mit CpG-ODN.....	55
4.3.4	Zusammenfassung.....	57
4.4	Interleukin-33 .....	57
4.4.1	Nachweis des IL-33-Rezeptors (ST2/IL-1 R <sub>4</sub> ) .....	57
4.4.2	Stimulation von CLPF mit IL-33, Dosis-/Zeitabhängigkeit.....	61
4.4.3	Zusammenfassung.....	69
4.4.4	Einfluss der Stimulationen auf die Signaltransduktion von IL-33 .....	69
4.4.5	Zusammenfassung.....	75
4.5	Kostimulationsexperimente .....	76
4.5.1	Stimulation von KO-, MC- und MCS-CLPF mit TNF und TNF+IL-33 .....	76
4.5.2	Stimulation von KO-, MC- und MCS-CLPF mit LPS und LPS+IL-33 .....	78

4.5.3	Stimulation von KO-, MC- und MCS-CLPF mit CpG-ODN und CpG-ODN+IL-33 .....	80
4.5.4	Zusammenfassung.....	82
4.6	LPS+IL-33 Dosisabhängigkeit.....	83
4.6.1	Stimulation von KO-CLPF mit LPS und steigender Dosis von IL-33 .....	83
4.6.2	Stimulation von MC-CLPF und MCS-CLPF mit LPS und steigender Dosis von IL-33 .....	85
4.6.3	Zusammenfassung.....	87
4.7	Zusammenfassung der Effekte von IL-33 bei CLPF .....	87
4.8	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	89
5	Diskussion.....	90
5.1	Effekte der TLR-Liganden auf CLPF.....	90
5.1.1	MC-CLPF reagieren auf Stimulation mit LPS nach 24 h mit stärkerer IL-6/IL-8-Sekretion als MCS- und KO-CLPF .....	90
5.1.2	MC- und MCS-CLPF reagieren nicht mit gesteigerter IL-6/IL-8-Sekretion auf CpG-ODN .....	92
5.2	Expression des IL-33-Rezeptors.....	94
5.2.1	CU-CLPF exprimieren den IL-33-Rezeptor stärker als KO-, MC- und MCS-CLPF.....	94
5.2.2	MC-LPMZ exprimieren den IL-33-Rezeptor stärker als KO- und CU-LPMZ .....	95
5.3	IL-33 stimuliert in KO-, MC- und MCS-CLPF die IL-6/IL-8-Sekretion signifikant .....	96
5.4	Einfluss von IL-33 und TLR-Liganden auf die Signaltransduktion.....	98
5.4.1	p-ERK 42/44 wird in MCS-CLPF durch die Stimulation mit TNF+IL-33 sowie CpG-ODN+IL-33 verstärkt aktiviert.....	98
5.5	Kostimulation mit TLR-Liganden und IL-33.....	101
5.5.1	CpG+IL-33 führt zu IL-6/IL-8-Sekretion in MC-CLPF, aber nicht in MCS-CLPF.....	101

6	Zusammenfassung und Ausblick .....	104
7	Literaturverzeichnis .....	106
8	Abbildungsverzeichnis .....	123
	Danksagung .....	126



## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AP-1	<i>activating protein-1</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CDAI	<i>Crohn's Disease Activity Index</i>
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CLPF	<i>colonic lamina propria fibroblasts</i>
CU	Colitis Ulcerosa
DARC	<i>duffy antigen / receptor for chemokines</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
ERK 1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
HMGB1	<i>high-mobility group protein B1</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IKK	<i>inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit</i>
IL	Interleukin
IRAK	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
JAK	Janus-aktivierte Kinase
JNK	Kinase/c-Jun N-terminus Protein Kinase
KO	Kontroll(e)
LPMZ	Lamina propria mononukleäre Zellen
LPS	Lipopolysaccharide
MAL	<i>MyD88-adaptor-like protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>

MC	Morbus Crohn
MCF	Morbus-Crohn-Fistel
MCS	Morbus-Crohn-Stenose
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
NPY	Neuropeptid-Y
NT-proBNP	<i>n-terminal pro brain natriuretic peptide</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pDC	Plasmazytoide dendritische Zellen
PRR	<i>pattern-recognition receptor</i>
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOCS	<i>suppressors of cytokine signalling</i>
sST2	<i>soluble ST2</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TAK1	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math> activated kinase 1</i>
TBST	<i>tris buffered saline</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau des Gastrointestinaltrakts

Der Aufbau des gesamten Magen-Darm-Trakts folgt einem einheitlichen Schema. Insgesamt bestehen alle Hohlorgane des Gastrointestinaltrakts aus vier Schichten. Von innen nach außen sind diese folgendermaßen angeordnet: Mucosa, Tela submucosa, Tunica muscularis und schließlich Serosa bzw. Tunica adventitia. Die Mucosa besteht wiederum aus drei Lagen: Die Lamina epithelialis bildet die innerste Schicht, anliegend die Lamina propria gefolgt von der Lamina muscularis. Die Lamina propria enthält Blut- und Lymphgefäße sowie glatte Muskelzellen, Drüsen und Lymphozyten, Fibroblasten und Histiozyten. Benachbart zur Mucosa befindet sich die Tela submucosa, eine bindegewebige Verschiebeschicht aus Kollagenfibrillen, in der sich Gefäße, Lymphbahnen und Nerven verzweigen und die Tunica muscularis versorgen. In der Tela submucosa befindet sich der Plexus submucosus, der für die viszeromotorische und -sensible Versorgung des Darms zuständig ist. Außen liegt die Tunica muscularis an, die mit Ausnahme des Magens in allen Verdauungsorganen aus zwei Schichten besteht, einem Stratum circulare innen und einem Stratum longitudinale außen. Zwischen beiden Schichten liegt der Plexus myentericus, der den Gastrointestinaltrakt viszeromotorisch innerviert. Der Plexus myentericus und submucosus steuern die Peristaltik und Motilität des Darms, können aber zusätzlich noch vom Sympathikus und Parasympathikus beeinflusst werden. Schließlich bilden die Tela subserosa und die Tunica serosa die äußersten Schichten. Die retroperitonealen Anteile von Duodenum und Colon sind nicht von Serosa sondern von einer Tunica adventitia umkleidet.

Die einzelnen Darmabschnitte unterscheiden sich bereits makroskopisch. Der Dünndarm besteht aus Duodenum, Jejunum und Ileum. Im Duodenum imponiert das Schleimhautrelief als Plicae circulares (Kerckring-Falten), die wiederum aus Zotten bestehen und nach aboral immer flacher werden. Die Plicae circulares kommen im gesamten Dünndarm vor, jedoch sind diese im Duodenum am ausgeprägtesten. Abgesehen von den Kerckring-Falten existieren ausschließlich im Duodenum die typischen Brunner-Drüsen.

Das Jejunum unterscheidet sich vom Ileum im Schleimhautfaltenrelief, da die Plicae circulares im Jejunum dichter stehen als im Ileum. Letzteres wiederum besitzt zahlreiche Peyer-Plaques in der Lamina propria, welche bei der immunologischen Abwehr eine wichtige Rolle spielen. Diese Lymphfollikel reichen bis in die Submukosa hinein. Die Lamina epithelialis des gesamten Dünndarms beinhaltet M-Zellen. Ihre Aufgabe besteht darin, Antigene aufzunehmen und sie in den Keimzentren der Follikel zu präsentieren, woraufhin eine Aktivierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen stattfindet und diese dann IgA sezernieren. Im gesamten Dünndarm sind Zotten vorhanden, im Jejunum und Ileum zusätzlich Krypten. In der Tiefe der Krypten liegen Paneth-Zellen, Stammzellen, Enterozyten mit Mikrovilli, enteroendokrine Zellen sowie Becherzellen.

Der Dickdarm besteht aus Caecum mit Appendix vermiformis, Colon ascendens, Colon transversum, Colon descendens und geht über das Colon sigmoideum schließlich in das Rektum über. Colon ascendens und Colon descendens liegen sekundär retroperitoneal und besitzen daher kein Mesocolon. Abgesehen von Appendix vermiformis, Caecum und Rektum unterscheidet sich der Dickdarm durch drei wesentliche Merkmale vom Dünndarm: Von außen sind die charakteristischen drei Taenien (Stratum longitudinale der Tunica muscularis), Appendices omentales sowie Haustren sichtbar, innen sind Plicae semilunares coli ausgebildet. Zudem besitzt der Dickdarm keine Zotten, sondern ausschließlich Krypten, die sogenannten Lieberkühn-Krypten. Die Mucosa des Dickdarms enthält wenige enteroendokrine Zellen, aber weitaus mehr Becherzellen als die Dünndarm-Mucosa. Die Submucosa von Colon und Appendix enthält zahlreiche Folliculi lymphatici.

Das Bindegewebe des Darms besteht überwiegend aus Kollagen I und Kollagen III; diese werden von Fibroblasten und glatten Muskelzellen gebildet.

## **1.2 Morbus Crohn**

### **1.2.1 Epidemiologie**

Morbus Crohn (MC) zählt wie auch Colitis Ulcerosa (CU) zu den Krankheiten aus dem Spektrum der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Die Inzidenz von Morbus Crohn beträgt in Mitteleuropa 5,2 bis 8,6 Fälle pro 100.000 Einwohner [1]. Die Prävalenz beträgt 120 bis 200 pro 100.000 Einwohner [1]. Die höchste Inzidenz und Prävalenz an Fällen von Morbus Crohn besteht in Nordeuropa und Nordamerika. Während in diesen Ländern die Anzahl von Kranken stabil bleibt, verzeichnen Kontinente und Regionen, die bisher eine niedrige Inzidenz und Prävalenz von Morbus Crohn aufwiesen, wie Asien, Afrika, Lateinamerika und Südeuropa, eine Zunahme an Morbus-Crohn-Erkrankungen [2]. Auch gibt es ethnische Unterschiede; so hat die jüdische Bevölkerungsgruppe insgesamt ein deutlich erhöhtes Risiko an Morbus Crohn zu erkranken. Bei Auswanderung gleicht sich die Inzidenz allerdings in den nachfolgenden Generationen der Inzidenz der Region, in die sie auswandern, an. Bei den in Ungarn lebenden Sinti und Roma dagegen verhält es sich anders. Diese sind auch in den nachfolgenden Generationen seltener von Morbus Crohn betroffen als die ungarische Bevölkerung, in der sie leben [3]. Ferner lässt sich feststellen, dass die nicht-kaukasische Bevölkerung eine niedrigere Inzidenz aufweist als die kaukasische [4]. Die Krankheitsmanifestation hat zwei Altersgipfel, einmal zwischen 15 Jahren und 34 Jahren und in der sechsten Lebensdekade [3, 5].

### **1.2.2 Morphologie**

Die Krankheit manifestiert sich in Form einer chronischen Entzündung des Gastrointestinaltrakts, welche den gesamten Verdauungstrakt von Mund bis zum Anus betreffen kann. Die häufigsten Lokalisationen sind terminales Ileum und Colon, das Rektum bleibt häufig ausgespart.

Die Entzündung des Darms ist beim Morbus Crohn im Gegensatz zur Colitis Ulcerosa transmural. Morbus Crohn geht mit einem charakteristischen Befalls-

muster einher, welches sich als diskontinuierliche oder segmentale Entzündung zeigt. Häufig manifestiert diese sich im ileocecalen Übergangsbereich. Ein anderes Charakteristikum ist das Vorhandensein von Granulomen in der Darmwand.

Die Krankheit wird in drei Krankheitsaktivitätsgrade eingeteilt. Zur Abgrenzung der einzelnen Stufen dient der *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI), bei Kindern entsprechend der *Pediatric Crohn's Disease Activity-Index* sowie neuerdings der CRP-Wert, der bei einer hohen Krankheitsaktivität  $> 10$  mg/l betragen muss [1]. Die CDAI-Skala reicht von 0 bis 600. In den CDAI gehen folgende Faktoren mit ein: Allgemeinbefinden, Gewichtsverlust, Fieber, Hämoglobin, Anzahl flüssiger Stühle pro Woche und weitere Beschwerden. Bei einem CDAI von bis zu 150 befindet sich die Krankheit in Remission. Ein höherer CDAI deutet auf einen akuten behandlungsbedürftigen Schub hin. Werte über 300 finden sich bei einem schweren akuten Schub [6, 7].

Bei der milden Form der Entzündung zeigen sich Aphten und oberflächliche Exulzerationen auf der Darmschleimhaut. Die aktivere Form zeichnet sich durch landkartenartige Läsionen, die sogenannten *skip lesions*, sowie durch Mukosa, die von Exulzerationen umschlossen ist, das sogenannte „Pflastersteinrelief“, aus. Typisch für Morbus Crohn sind auch die in der Endoskopie sichtbaren *snail tracks*, welche als langgezogene Ulzerationen imponieren. Bei einer starken Entzündung kommt es häufig wie bei der Colitis Ulcerosa zur Ausbildung von zahlreichen Pseudopolypen.

Mikroskopisch sind häufig aphtoide Läsionen und von Makrophagen gebildete nicht verkäsende Granulome nachweisbar. Subseröse Lymphozytenaggregate sowie Abschnitte von transmuraler Entzündung mit Fissuren gefolgt von normaler Mukosa sind weitere typische histologische Befunde.

Die aktive Phase eines Morbus Crohn geht mit einer fokalen Entzündung oft mit Fistelbildung und durch Fibrosierung entstandenen Strikturen und Stenosen einher. Dadurch kann es zu rezidivierenden Darmverschlüssen oder im Falle einer perforierend-fistulierenden Entzündung zu Abszessen kommen.

### 1.2.3 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie ist noch in weiten Teilen unbekannt, eine multifaktorielle Genese gilt als wahrscheinlich. Unter vielen Faktoren gelten vor allem Umweltfaktoren, immunologische Faktoren und eine genetische Prädisposition als ätiopathogenetisch [3].

Eine positive Familienanamnese stellt einen Risikofaktor dar. Verwandte ersten Grades eines an Morbus Crohn erkrankten Patienten besitzen ein 20-fach höheres Risiko an Morbus Crohn zu erkranken als die durchschnittliche Population. Zudem ist aus Zwillingsstudien bekannt, dass monozygote Zwillinge ein höheres Risiko haben an Morbus Crohn zu erkranken als dizygote Zwillinge [8, 9]. Ferner weiß man, dass Mutationen im Gen NOD2/CARD15 auf Chromosom 16 zu einer erhöhten Anfälligkeit für die Entstehung von Morbus Crohn führen [10-14]. Homozygote Träger von NOD2-Mutationen haben eine 20-fach höhere Suszeptibilität für Morbus Crohn als der Durchschnitt. Bei heterozygoten Trägern ist das Risiko auch erhöht, jedoch geringer als bei Homozygoten. Inzwischen wurden über 70 Risiko-Genregionen identifiziert [15], welche in Zusammenhang mit einer erhöhten Empfänglichkeit für Morbus Crohn stehen.

Zu den Umweltfaktoren, welche einen Einfluss auf die Krankheitsentstehung und den Verlauf haben, zählt zum Beispiel das Rauchen. Während Raucher ein erhöhtes Risiko haben an Morbus Crohn zu erkranken, nimmt bei der Colitis Ulcerosa dagegen derselbe Faktor eine protektive Rolle ein [16]. Zudem haben rauchende Morbus Crohn Patienten ein erhöhtes Risiko für eine Rezidiventwicklung nach Operation und damit einhergehend ein höheres Risiko sich wiederholten Operationen zu unterziehen [17, 18]. Bei Patienten, die mit dem Rauchen aufhören, sinkt sowohl das Risiko Exazerbationen zu erleiden als auch der therapeutische Bedarf an Steroiden und anderen Immunsuppressiva [19]. Jedoch scheinen bei dem Faktor Rauchen auch noch ethnische und geographische Faktoren eine Rolle zu spielen. Bei jüdischen Rauchern konnte kein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Morbus Crohn nachgewiesen werden [20]. Kontrazeptivaeinnahme als weiterer Risikofaktor erhöht ebenso die Wahrscheinlichkeit an Morbus Crohn zu erkranken. Bei langjähriger Kontra-

zeptivaeinnahme ist das Risiko an Morbus Crohn zu erkranken höher als nach lediglich halbjähriger Einnahme [21, 22]. Ein anderes Beispiel für einen unabhängigen Faktor, der die Wahrscheinlichkeit erhöht an Morbus Crohn zu erkranken, ist eine Appendektomie. Der genaue Pathomechanismus ist unbekannt. Diskutiert wird, dass eine Appendix-Entfernung das intestinale mucosale Immunsystem derart beeinflusst, dass die Entstehung von Morbus Crohn begünstigt wird [23, 24]. Weitere Elemente, die als Ursachen der Krankheitsentstehung diskutiert werden, sind Ernährungsgewohnheiten und diätetische Komponenten [25-28]. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Personen mit einem höheren sozialen Status anfälliger für Morbus Crohn sind als Personen mit niedrigem sozialen Status [29]. Andere Studien zeigten, dass Stillen protektiv gegen die Ausbildung von Morbus Crohn für das Baby wirkt und auch der zunehmenden Hygiene, einhergehend mit der westlichen Lebensweise, wird eine große Bedeutung bei der Krankheitsentstehung zugesprochen [30, 31]. Perinatale und postnatale Infektionen wie zum Beispiel Masern, aber auch die Masern-Impfung wurden lange Zeit als Ursachen für Morbus Crohn diskutiert [32-35]. Jedoch finden sich auch Studien, die diese Hypothesen widerlegen [36-38]. Schließlich existiert bis heute die Hypothese, dass eine Infektion mit Mykobakterium avium paratuberculosis ein Auslöser von Morbus Crohn sei. Mykobakterium avium paratuberculosis löst in Wiederkäuern und anderen Tieren die Johne's Krankheit aus, die sich durch Durchfälle und eine granulomatöse Entzündung der Eingeweide auszeichnet. Daher kam die Idee auf, dass dieser Keim auch für Morbus Crohn verantwortlich sein könnte [39, 40]. Viele Studien haben in Darmbiopsien von Morbus Crohn Patienten den Erreger nachweisen können [41-43]. Jedoch konnten die Ergebnisse in anderen Studien nicht reproduziert werden, abgesehen von der Tatsache, dass der Erreger auch in der Darmmucosa von Gesunden gefunden wurde [10, 44-46]. Trotz der widersprüchlichen Studienlage sollte der Einfluss von Mykobakterium paratuberculosis nicht ganz außer Acht gelassen und weiterhin genau untersucht werden [47-50].

Insgesamt wird heute angenommen, dass ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischer Immunantwort einen erheblichen Beitrag an der Krankheitsentstehung des Morbus Crohn leistet [51-53]. Eine mögliche Erklärung könnte



sein, dass in einem genetisch prädisponierten Menschen es zu einer überaktiven Immunantwort des Darms gegen symbiotische Bakterien kommt. Diese Überaktivierung führt zur verstärkten proinflammatorischen Zytokinsynthese mit Lymphozytenaktivierung und resultiert dann in einer chronischen intestinalen Entzündung [54, 55].

#### **1.2.4 Klinik**

Die Klinik ist durch meist nicht-blutige Durchfälle, die länger als sechs Wochen andauern, abdominelle Schmerzen häufig im rechten Unterbauch, Gewichtsverlust sowie Fieber bei höherer Krankheitsaktivität gekennzeichnet. Betroffene Kinder fallen oft erst durch Wachstumsstörungen oder eine verspätete Pubertät auf. Durch die Entzündung des Darms kommt es zu einer Malabsorption und einer Malassimilation. Damit einhergehend kommt es zu Komplikationen wie Steatorrhoe durch Gallensäureverlust, mit Mangel an fettlöslichen Vitaminen (A, D, E, K), aber auch allen anderen Vitaminen, Gerinnungsstörungen, erhöhter Oxalatausscheidung und dadurch bedingten Nierensteinen. Der Vitamin D- und Kalziummangel führen in Verbindung mit der chronischen Entzündung und häufigen Glukokortikoidbehandlungen oft zu einer Osteoporose. Der Vitamin B<sub>12</sub>-Mangel kann sich unter anderem in Form einer megaloblastären Anämie äußern.

Morbus Crohn geht auch mit extraintestinalen Manifestationen einher. Bis zu einem Drittel der Crohn-Patienten sind von diesen betroffen. Sie äußern sich vor allem an Haut, Augen, Gelenken und Leber. Zu den häufigsten Manifestationen, die die (Schleim-) Haut betreffen, gehört das Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, Psoriasis, perianale Marissen und die aphtöse Stomatitis. 15 % bis 20 % der Morbus Crohn Patienten sind von extraintestinalen Symptomen an der Haut betroffen [56-58]. Am Auge manifestiert sich die Krankheit als Uveitis/Iritis, Episkleritis. Zu extraintestinalen Manifestationen des rheumatoiden Kreises gehören die Spondylitis ankylosans sowie die hypertrophe Osteoarthropathie. Die Beteiligung des axialen Skelettsystems gehört zu den häufigsten extraintestinalen Manifestationen. Die Leberbeteiligung kann sich als Fettleber, Gallensteinleiden oder primär sklerosierende Cholangitis (PSC)

äußern, wobei Patienten mit Colitis Ulcerosa von der PSC häufiger betroffen sind als Patienten mit Morbus Crohn. Die Entwicklung einer PSC geht mit einem erhöhten Risiko einher, ein Gallengangs- aber auch ein Colonkarzinom zu entwickeln.

### **1.2.5 Komplikationen**

Typische Komplikationen von Morbus Crohn sind Fisteln, Abszesse sowie Stenosen. Stenosen ziehen häufig Darmverschlüsse nach sich mit der Notwendigkeit einer Operation. Diese Komplikationen führen nicht selten zum ersten Mal zu der Diagnose Morbus Crohn. Unter den Fisteln stellen die perianalen Fisteln die häufigsten dar. Weitere sind enteroenterische Fisteln, enterovesikale Fisteln, enterovaginale Fisteln sowie Fisteln zwischen Darm und Harnleiter. Weitere Komplikationen sind Konglomerattumore, die zu einer Ureterobstruktion führen können und das toxische Megacolon. Zudem besteht ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung von Dünndarm- und Dickdarmkarzinomen [59, 60].

### **1.2.6 Diagnostik**

Die Diagnose wird nach einer Zusammenschau von Anamnese, klinischer Untersuchung, Endoskopie und bildgebenden Verfahren gestellt. Die Ileokoloskopie bzw. bei entsprechenden Symptomen die Gastroduodenoskopie sind unabdingbar; mit Hilfe der gewonnenen Biopsien kann die Krankheit histologisch gesichert werden. Zur Beurteilung des Dünndarmbefalls kommt heute vorwiegend die transabdominelle Sonographie sowie die CT- oder das MR-Enteroklysma bzw. die CT-oder MR-Enterographie oder die Kapselendoskopie zum Einsatz. Die Labordiagnostik sollte die Bestimmung von CRP und Blutbild enthalten. Abgesehen von den Standardlaborwerten wie Elektrolyten, sowie Nierenretentionswerten, können bei Verdacht auf PSC Gamma-Glutamyl-Transferase und Alkalische Phosphatase sowie p-ANCA bestimmt werden. Mikrobiologische Tests auf darmpathogene Keime sollten zum Ausschluss einer Gastroenteritis mit dem klinisch meist führenden Symptom der Diarrhoe durchgeführt werden.

Typischerweise sind bei Morbus Crohn Patienten im Labor das CRP und die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit erhöht, eine Anämie mit erniedrigtem Serumeisen, Leukozytose und Thrombozytose sowie eine Hypalbuminämie treten in schweren Fällen auf. Bei Patienten, denen bereits ein Segment des terminalen Ileums reseziert wurde, sollte Vitamin B<sub>12</sub> bestimmt werden.

Ein Großteil der Patienten zeigt in der Serologie eine Positivität für ASCA (anti-saccharomyces-cerevisiae-Antikörper). Weitere Antikörper (AK), welche im Serum nachweisbar sind, sind Antikörper gegen I2, Antikörper gegen OmpC, p-ANCA, Flagellin-Antikörper und Antikörper gegen CBir1. Diese Antikörper scheinen ein Prädiktor für einen komplizierten Verlauf und eine häufige Schubfrequenz zu sein [61, 62].

Für die Diagnosesicherung ist neben dem klinischen Verlauf und dem Befallsmuster die Histologie der gewonnenen Biopsien entscheidend. Laut den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten gibt es bestimmte Kriterien wie beispielsweise eine Kryptenarchitekturstörung und der Nachweis von Granulomen, die bei der Diagnosesicherung von Morbus Crohn hilfreich sind.

### **1.2.7 Therapie**

Eine kurative Therapie ist für Morbus Crohn nicht bekannt. Alle therapeutischen Ansätze dienen dazu, die Entzündungsaktivität zu reduzieren, um die Lebensqualität sowie die Darmfunktion zu erhalten und Komplikationen vorzubeugen.

Therapeutisch wird die Schub- von der Basistherapie unterschieden. Die Therapie richtet sich vor allem nach Krankheitsaktivität und Lokalisation der Entzündung. Bei einem leichten bis mittelschweren Schub werden lokal wirksame Glukokortikoidderivate wie z. B. Budesonid als Therapeutika angewandt. Diese können beim Befall des Rektums oder Sigmas auch als Klysma verabreicht werden. Bei stärkerer Krankheitsaktivität kommen gegebenenfalls systemische Glukokortikoide zum Einsatz.

Treten bei mäßiger Entzündungsaktivität Komplikationen auf, sollten zusätzlich eine antibiotische Therapie bzw. operative Verfahren angewandt werden. Bei hoher Krankheitsaktivität werden therapeutisch primär systemische Glukokortikoide eingesetzt. Bei mangelndem Ansprechen oder Glukokortikoidabhängigkeit kommen Immunsuppressiva wie Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Methotrexat oder Ciclosporin und Tacrolimus zum Einsatz. Sollten auch diese Therapieversuche ohne Erfolg bleiben, können nach vorheriger chirurgischer Abwägung „Biologicals“ wie z. B. die Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) - Antikörper Infliximab und Adalimumab verabreicht werden. Diese können in Einzelfällen auch vor Immunsuppressivagabe als Behandlungsmöglichkeit erwogen werden, weil sie in der Akutsituation schon nach einigen Tagen wirken während die anderen Immunsuppressiva, wie Azathioprin oder Methotrexat erst nach Wochen oder Monaten eine Wirkung zeigen [63]. Zudem sind sie, wie auch die konventionellen Immunsuppressiva, steroideinsparend und führen zu einer höheren Knochendichte [64, 65]. Ferner wirkt sich Infliximab positiv auf Arthralgien und Arthritis bei Morbus Crohn Patienten aus [66]. Jedoch kann diese Medikamentenklasse die Entstehung von malignen Erkrankungen begünstigen sowie eine Tuberkulose und opportunistische Infektionen reaktivieren [67-72]. In allen Stufen der Krankheitsaktivität mit distalem Befall sollten lokale Maßnahmen in Form von Steroid- oder 5-ASA (5-Aminosalicylsäure)- enthaltenden Suppositorien, Klysmen oder Schäumen zusätzlich angewandt werden. Der Befall des Ösophagus und Magens wird auch frühzeitig mit Prednisolon und zusätzlich Protonenpumpenhemmern behandelt, bei Therapieversagen ist wie beim Ileozökalbefall vorzugehen. Bei Kindern stellt die Ernährungstherapie immer das Mittel der ersten Wahl dar. Immunsuppressiva sind vor Steroiden zu bevorzugen, um steroidbedingte Wachstumsstörungen zu verhindern [73, 74].

Ob eine remissionserhaltende Therapie durchgeführt werden soll und welche Medikation hierfür verwendet wird, muss abhängig von Krankheitsverlauf und Risikoprofil für jeden Patienten individuell entschieden werden.

Die Indikation zu einer abdominalen Operation ist bei Morbus Crohn restriktiv zu stellen, da die Betroffenen postoperativ häufig unter schweren Komplikationen, wie zum Beispiel Kurzdarmsyndrom oder Anastomoseninsuffizienz, leiden.

Fisteln werden erst therapiert, wenn sie symptomatisch sind. Abhängig von der Fistellokalisation stehen chirurgische Sanierung und/oder Medikamente, wie Azathioprin, Antibiotika und „Biologicals“, als Möglichkeiten der Therapie zur Verfügung [75-78].

### 1.3 Zytokine

Zytokine sind Glykoproteine, die für Zelldifferenzierung, Proliferation und Wachstum unabdingbar sind. Sie werden insbesondere von Makrophagen und dendritischen Zellen synthetisiert und sind für die immunologische Abwehr wichtig. Es gibt fünf Gruppen von Zytokinen: Interleukine (IL), Interferone (IFN), Tumornekrosefaktor (TNF), Kolonie-stimulierende Faktoren und Chemokine. Eine andere Unterteilung ist die in pro- und antiinflammatorische Zytokine. Zu den proinflammatorischen Zytokinen gehören TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, *Macrophage Migration Inhibitory Factor* und *Platelet Activating Factor*, IL-4, IL-10, IL-13, IL-1RA und *transforming growth factor* (TGF) -  $\beta$  gehören zu den antiinflammatorischen Zytokinen. Aufgaben der Zytokine sind die Steuerung der Hämatopoese, der Proinflammation, der Immunregulation sowie die Beteiligung an der Reparatur von Gewebeschäden. Zytokinrezeptoren gehören mit Ausnahme des IL-8-Rezeptors zu Tyrosinkinase-Rezeptoren. Die Synthese und Ausschüttung der Zytokine erfolgt, wenn ein *pattern-recognition receptor* (PRR) ein *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) bindet. PAMPs sind charakteristische Strukturen auf Erregern und können durch PRRs erkannt werden, weil sie nicht im menschlichen Organismus vorkommen. Beispiele für solche Muster sind zum Beispiel Lipopolysaccharide (LPS) bei gramnegativen Bakterien oder Arabinomannan bei Pilzen. PRRs sind spezifische Mustererkennungszustoren, die „körpereigen“ von „körperfremd“ unterscheiden. Durch die Ausschüttung der Zytokine kommt es zum Teil zur Synthese von Akute-Phase-Proteinen in der Leber. Diese wirken chemotaktisch und aktivierend auf Lymphozyten. Ein wichtiges und vielseitiges Zytokin, welches im Rahmen dieser Arbeit als Positivkontrolle verwendet wird, ist TNF. Dieses wird unter anderem von Makrophagen, Monozyten, aktivierten T-Zellen und NK-Zellen sowie B-Zellen

produziert. TNF-Rezeptoren kommen auf allen kernhaltigen Zellen vor. Zu der TNF-Rezeptorfamilie gehören TNFR1, TNFR2 sowie die Decoy-Rezeptoren. Erstere sind Transmembranproteine und zeichnen sich durch ihre Cysteinreichen Domänen aus. TNF wirkt lokal und systemisch. Lokal kann es zu einer Entzündungsreaktion führen mit den klassischen Symptomen Calor, Dolor, Rubor, Tumor, Functio laesa; systemisch ist es unter anderem an der Pathogenese der Sepsis beteiligt [79, 80]. TNF aktiviert Makrophagen sowie neutrophile Granulozyten und wirkt auf letztere migrationsfördernd. Durch die Aktivierung der Makrophagen kommt es zur Phagozytose von Erregern und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie z. B. IL-1 und IL-6 [81]. Zudem führt TNF zur Lockerung von Zell-Zell-Kontakten in Endothelzellen und führt zur Expressierung von Selektinen [79, 81]. Andere Zielgebiete von TNF sind außerdem die Beteiligung an der Apoptose, das Hervorrufen einer katabolen Stoffwechsellage, eine pyrogene Wirkung und schließlich führt TNF zur vermehrten Ausschüttung von CRH [82]. Studien haben gezeigt, dass TNF in der intestinalen Mukosa von Morbus Crohn Patienten vermehrt exprimiert wird. Daher wird in der Behandlung von Morbus Crohn Patienten eine Anti-TNF-Therapie mit monoklonalen AK (z. B. Infliximab) erfolgreich zur Remissionsinduktion eingesetzt. Die Anti-TNF-AK führen zu einer Reduktion der T-Helferzell-Typ1 ( $T_H1$ )-Antwort mit konsekutiver Reduktion der Entzündung [83].

### 1.3.1 Interleukin-6

Die Entdeckung von IL-6 liegt in der Zeit zwischen 1986 und 1987. Damals wurde es von einigen Forschergruppen unabhängig voneinander entdeckt und dementsprechend existierten verschiedene Namen für das gleiche Protein, u. a. 26K, IFN- $\beta$ 2, BSF-2. Später folgte die Entdeckung, dass Antikörper gegen IL-6 die Aktivität von Hepatozyten-stimulierenden-Faktor hemmen [84]. Diese Entdeckung führte zu der Schlussfolgerung, dass IL-6 einen wichtigen Regulator der Akute-Phase-Reaktion darstellt. Interleukin-6 nimmt in der Immunabwehr eine besondere Stellung unter den Zytokinen ein, da es in der Immunantwort beim Übergang von der angeborenen zur erworbenen Immunität als Schlüsselzytokin

dient. Dabei spielt IL-6 in der frühen Phase der T-Zell-Aktivierung eine wichtige Rolle, indem es dazu führt, dass die T-Zellen aus der G0 in die G1-Phase übergehen (Abb. 1). In der G1-Phase sprechen sie besser auf IL-2 an. Der weitere Progress im Zellzyklus wird dann durch die synergistische Wirkung von IL-6 und IL-1 kontrolliert. IL-1 wiederum ist für die Induktion von IL-2 notwendig [85].

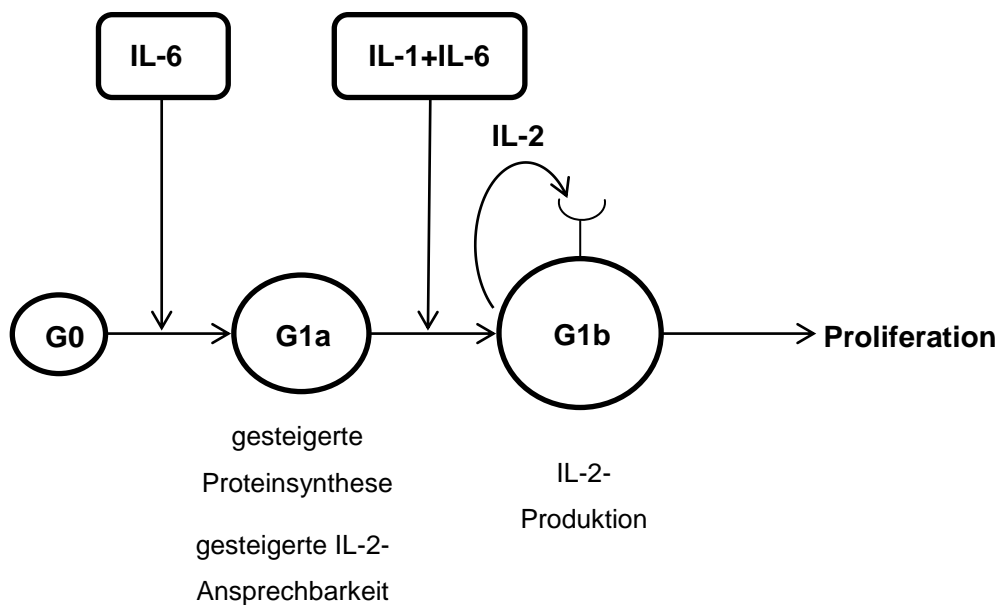


Abbildung 1: Aktivierung von ruhenden T-Zellen (in Anlehnung an Van Snick [85])

IL-6 ist ein Ein-Ketten-Protein mit einer Masse von 21-28 kDa (abhängig vom Grad der Glykosylierung und Phosphorylierung). Nach der Translation unterläuft es einigen N- und O-Glykosylierungen sowie Phosphorylierungen von Serinresten. Das kodierende Gen enthält vier Introns und fünf Exons und ist auf Chromosom 7 (7p21) lokalisiert. Interleukin-6 besitzt zwei Rezeptortypen, an die es binden kann, einen transmembranären- und einen löslichen Rezeptor. Durch die Bindung an den transmembranären Rezeptor wird die Wirkung mittels rezeptorgebundenem Glykoprotein gp130 entfaltet. Der lösliche Rezeptor (sIL-6R) wirkt via „IL-6-trans-signalling“. Bei diesem Vorgang bildet IL-6 zusammen mit dem löslichen Rezeptor einen Komplex und bindet direkt an gp130, welches in zahlreichen Zellmembranen vorkommt. Durch die Bindung wird

gp130 sowie die rezeptorgebundene Janus-aktivierte Kinase 1 (JAK1), JAK2 und Tyrosinkinase 2 aktiviert. Daraufhin kommt es zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten an den intrazellulären Domänen, welche wiederum *signal transducers and activators of transcription* STAT1/STAT3 und die *Src homology region 2 domain-containing phosphatase* 2-Kaskade aktivieren. Die Signalkaskaden führen schließlich zur Transkription bestimmter Gene im Zellkern.

IL-6 wird in zahlreichen Zelltypen produziert, vor allem in aktivierten Monozyten und Makrophagen, aber auch in Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Mastzellen, Leukozyten, T-Zellen und vielen Tumorzelllinien (zum Beispiel kardiales Myxom) [86]. IL-6 wird nicht konstitutiv produziert, sondern als Reaktion auf Erreger (bakterielle Endotoxine, Viren, Mitogene) und andere Zytokine. Unter den Zytokinen, die eine IL-6 Produktion induzieren, finden sich unter anderem auch IL-1 und TNF. IL-1 ist der potenteste Induktor von IL-6 in Fibroblasten. In Knochenmarkszellen dagegen wird die IL-6 Produktion am stärksten durch IL-3 oder GM-CSF induziert [87, 88]. Bei viralen Erkrankungen des ZNS wird IL-6 von Astrozyten und Mikroglia sezerniert. Dadurch wird einerseits das Immunsystem aktiviert, andererseits aber auch die Reparatur des Hirngewebes beschleunigt. Wahrscheinlich wird IL-6 auch im Vorderhorn der Hypophyse, in den *folliculostellate cells* produziert. IL-6 selbst wirkt auf die Hypophyse sekretagog (Abb. 2), indem es die Sekretion von ACTH fördert [85]. Außerdem wirkt es endogen pyrogen. Zudem ist IL-6 an der Hämatopoese sowie an der Differenzierung und Maturation von B-Zellen zu AK-produzierenden Plasmazellen beteiligt. Weitere Beobachtungen haben einen Einfluss von IL-6 auf das Knochen- und Endometriumwachstum gezeigt. Abgesehen von den Auswirkungen auf Proliferation und Differenzierung von normalen Prekursorzellen, bewirkt IL-6 auch eine Wachstumshemmung von verschiedenen Karzinom- und Lymphomzelllinien [85].

IL-6 ist von klinischer Bedeutung, da es Hinweise gibt, dass ein Zusammenhang zwischen zu starker IL-6-Synthese und Autoimmunkrankheiten besteht [89]. Beispielsweise lässt sich eine positive Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität bei rheumatoider Arthritis und dem IL-6-Spiegel sowie der Krankheitschwere des septischen Schocks und dem IL-6-Spiegel nachweisen. Zudem



weisen MC-Patienten mit hoher Krankheitsaktivität und mit extraintestinalen Manifestationen höhere IL-6-Serum-Spiegel auf als Patienten mit niedrigerer Aktivität [86].

Bei Patienten, die an Morbus Crohn leiden, ist die Hypothalamus-Hypophysen-Achse dysreguliert. MC-Patienten weisen höhere Neuropeptid-Y-Spiegel (NPY) (als Marker der hypothalamischen Achse) auf als Gesunde. MC-Patienten mit vorangehender Steroid-Therapie weisen dabei höhere Spiegel als Patienten ohne vorangehende Steroidtherapie auf. Serum-Kortisol-Spiegel dagegen sind trotz erhöhter NPY-, TNF- und IL-6-Spiegel bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung niedriger als bei Gesunden. Zudem sind die Serum-Kortisolspiegel bei MC-Patienten mit vorangehender Steroidtherapie niedriger als bei denen ohne vorangegangene Steroidtherapie. Anhaltende Stimulation mit IL-6 führt zu einem verminderten Ansprechen auf IL-6. Dies ist bei MC-Patienten verstärkt der Fall, da bei diesen die IL-6-Spiegel im Vergleich zu Gesunden erhöht sind, sodass IL-6 selbst die verminderte Ansprechrate der Hypothalamus-Hypophysen-Achse aufrechterhält [90]. Während bei Gesunden eine positive Korrelation zwischen Kortisol und NPY besteht, ist bei Morbus Crohn Patienten keine bzw. eine negative Korrelation vorhanden.

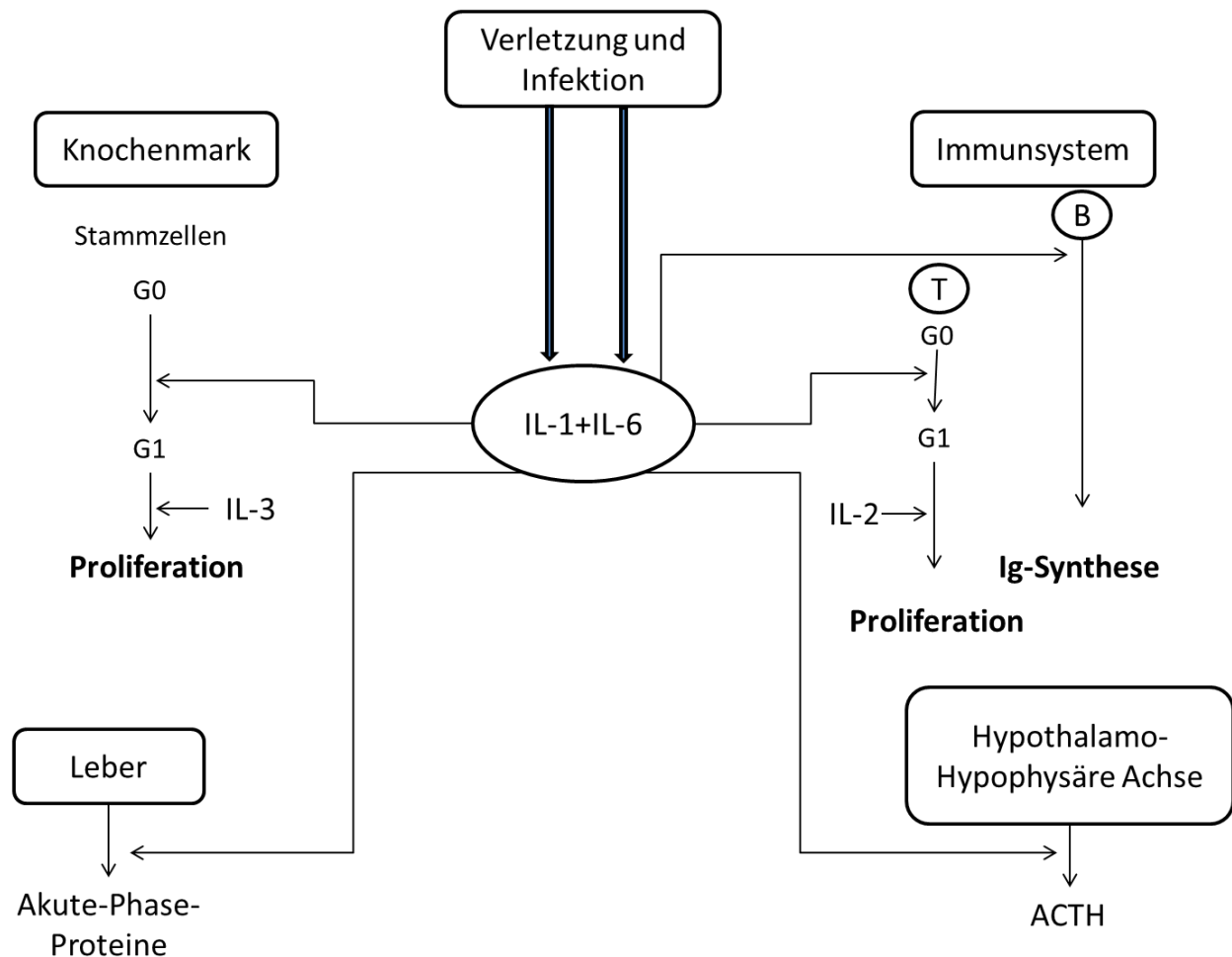


Abbildung 2: IL-6/IL-1-Antwort auf unbestimmten externen Reiz (in Anlehnung an Van Snick [85])

### 1.3.2 Interleukin-8

Interleukin-8 ist ein Zytokin, das zu der Gruppe der Chemokine gehört. Es ist eines der bestbekannten Chemokine, welches zu einer Rekrutierung von Leukozyten, insbesondere der Neutrophilen führt und am Entzündungs-geschehen als Mediator beteiligt ist [91]. Es gibt zwei Untergruppen von Chemokinen: die CXC-Motiv-Chemokine (eine Aminosäure zwischen den zwei Cysteinresten), die vor allem auf Neutrophile wirken sowie die CC-Motiv-Chemokine (keine Aminosäure zwischen den Cysteinresten), die Basophile, Eosinophile, Monozyten und Lymphozyten aktivieren können. Die CXC-Chemokine werden auf Chromosom 4, die CC-Chemokine auf Chromosom 17

kodiert [92]. IL-8 gehört wie auch der *Platelet Factor 4* zu den CXC-Motiv-Chemokinen und ist das potenteste aller CXC-Chemokine.

Das Präcursorprotein von Interleukin-8 besteht aus 99 Aminosäuren. Nach mehreren Modifikationen wird das Protein auf 72 Aminosäuren reduziert [93]. Innerhalb der Proteinstruktur finden sich zwei Disulfidbrücken, die für die biologische Aktivität wichtig sind. In Lösung bildet IL-8 Dimere, jedoch ist unklar, ob es als Monomer oder als Dimer agiert [94].

Interleukin-8 wird von Endothelzellen, Epithelzellen, Monozyten und Fibroblasten nach Stimulierung durch Stressfaktoren wie z. B. IL-1 und TNF produziert. Dabei wird es v. a. im Rahmen von Entzündung, Ischämie oder Trauma produziert [91]. Bei intradermaler Applikation z. B. von IL-8 lässt sich in experimentellen Versuchen eine massive Akkumulation von Neutrophilen sowie eine Plasmaexsudation beobachten [95].

Die Funktionen von Interleukin-8 sind neben der Akkumulation von Neutrophilen die Induktion von Chemotaxis, die Induktion von Zellformänderung, Anstieg von intrazellulärem Kalzium, die Hochregulation der Expression von Adhäsionsproteinen wie z. B. Mac-1 (CD11b/CD18) und dem Komplementrezeptor [96] sowie die Granulafreisetzung aus Zellen [91, 92]. Ferner hat IL-8 eine proangiogenetische Wirkung, die bei der Menstruation, der Tumervaskularisierung sowie der Wundheilung eine Rolle spielt [97].

In vitro wirkt Interleukin-8 auf Basophile chemotaktisch, jedoch nicht auf Eosinophile oder Monozyten [98]. Auf Lymphozyten lässt sich ebenfalls keine chemotaktische Wirkung beobachten, diese werden eher von CC-Chemokinen angelockt [99].

Interleukin-8 bindet an seine zwei Rezeptoren CXCR1 und CXCR2. Diese sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die 7 Transmembrandomänen beinhalten [100]. Der Rezeptor weist ein Molekulargewicht von 40 kDa auf [101]. Die Signaltransduktion findet dann über eine Aktivierung von Adenylatcyclasen, MAP-Kinasen sowie einen intrazellulären Kalziumanstieg statt [101]. Zudem bindet IL-8 auch an *duffy antigen / receptor for chemokines* (DARC). DARC gehört zu der

Familie der Chemokinrezeptoren, an den sowohl CC- als auch CXC-Proteine binden können [102, 103].

Klinisch ist Interleukin-8 bei entzündlichen Lungenerkrankungen von Bedeutung. Beispielsweise wurde in Alveolarmakrophagen von Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose eine erhöhte Expression von IL-8-mRNA im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen. Zudem zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der IL-8-mRNA sowie der Neutrophilenzahl, die aus der Bronchoalveolären Lavage gewonnen wurde, und dem Krankheitsschweregrad [104]. Ein anderes Beispiel ist das ARDS, bei dem sich ebenfalls eine erhöhte IL-8-Konzentration im Respirationstrakt zeigt. Hierbei scheinen die Neutrophilenzahl sowie die IL-8-Menge mit der Mortalität des ARDS sowie dem Risiko einer Empyemabildung zu korrelieren [105]. Andere Studien zeigten einen möglichen Zusammenhang zwischen Asthma bronchiale und erhöhten IL-8- und GM-CSF-Konzentrationen in Flimmerepithelzellen [106]. Bei Patienten mit Zystischer Fibrose steht eine Entzündung mit Neutrophileninfiltration im Vordergrund. Untersuchungen zeigten, dass sich im Mukus der Flimmerepithelzellen von Patienten mit Zystischer Fibrose hohe Spiegel an Neutrophiler Elastase finden. Die Neutrophile Elastase induziert eine gesteigerte Expression von IL-8 in den Flimmerepithelzellen. Dies führt zu einem Circulus vitiosus, in dem IL-8 weitere Neutrophile rekrutiert und die Entzündung des Respirationstraktes verstärkt [107].

### 1.3.3 Interleukin-33

2005 wurde erstmals IL-33 als Mitglied der IL-1-Familie erkannt [108]. IL-33 gehört zu der IL-1 R/TLR-Familie und wird seitdem auch als IL-1F11 bezeichnet [109]. Die IL-1-Zytokine sind im besonderen Maße am Entzündungsgeschehen beteiligt, indem sie die Expression von Zytokinen und Chemokinen sowie Metalloproteinasen „hochregulieren“. Eine Überaktivierung der IL-1-Familie führt deshalb zu Gewebsdestruktion [110]. Zu den Aufgaben von Interleukin-33 gehört die Stimulation von T-Helfer-Zellen ( $T_H$ ) sowie die Proliferationsförderung von B-Zellen [111-113]. Außerdem spielt es bei der Interleukin-Synthese eine Rolle und führt zur Aktivierung und Proliferation von NK- und Mastzellen [114, 115]. Im

Entzündungsgeschehen induziert IL-33 die Expression von Adhäsionsmolekülen wie *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1), *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) und *endothelial-leukocyte adhesion molecule-1*, die die Leukozytenmigration ermöglichen [116, 117]. Abgesehen davon wirkt IL-33 selbst auch chemotaktisch auf Neutrophile [118, 119] sowie auf T<sub>H</sub>2-Zellen [112, 120].

Zusammen mit IL-3 induziert IL-33 in basophilen Granulozyten die IL-4-Synthese [121]. IL-33 fungiert als ein Zytokin, welches das T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Gleichgewicht in Richtung T<sub>H</sub>2-Zellen verlagert [108]. Es kann Langerhans-Zellen zu dendritischen Zellen aktivieren, die dann Antigene über *major histocompatibility complex 2*-Proteine präsentieren und schließlich zur T<sub>H</sub>2-Zell-Antwort führen [122, 123]. Die aktivierten T<sub>H</sub>2-Zellen produzieren daraufhin Zytokine, insbesondere IL-4, IL-5 und IL-13 [108, 124, 125]. Diese spielen insbesondere bei der Immunantwort auf Parasiten, aber auch auf Allergene eine Rolle, indem sie eosinophile Granulozyten sowie Mastzellen aktivieren und zur Anregung der IgE-Produktion führen [126]. Es ist bereits bekannt, dass IL-4 als Schlüsselzytokin an der T<sub>H</sub>2-Zell-Aktivierung bei der Parasitenabwehr beteiligt ist. Die aktivierten T<sub>H</sub>2-Zellen können wiederum IL-4 sezernieren. Abgesehen von der IL-4-abhängigen T<sub>H</sub>2-Zell-Aktivierung existiert jedoch auch eine Parasitenabwehr durch T<sub>H</sub>2-Zellen, die keiner vorangehenden Aktivierung durch IL-4 bedarf [127]. Inzwischen konnten außer IL-4 drei weitere Zytokine (IL-25, IL-33 sowie *thymic stromal lymphopoietin* [TSLP]) als T<sub>H</sub>2-Zell-Aktivatoren identifiziert werden, die eine Verbindung zwischen angeborenem und spezifischem Immunsystem herstellen [128]. Dabei werden zunächst Epithelzellen im Darm oder in den Atemwegen durch Parasitenbestandteile stimuliert und diese sezernieren daraufhin IL-25, IL-33 und TSLP. Die Zytokine aktivieren eine bislang unbekannte Zellart und induzieren in diesen die Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-13. Dadurch wird die Differenzierung von B- und T<sub>H</sub>2-Zellen gefördert [128]. Aktuelle Studien dazu berichten über eine Zellart mit jeweils gleichen Oberflächenmarkern und haben diese Zellart jeweils verschieden genannt, nämlich T-Helfer-Zellen, Nuozyten und *multipotential precursor* (Mpp) <sup>type2</sup> - Zellen. Gemeinsam haben diese Zellen, dass sie auf IL-33 und IL-25 ansprechen und vor allem im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe ansässig sind [129-131].

IL-33 wird von vielen Zellen exprimiert, wie z. B. Fibroblasten, Adipozyten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Bronchial-Epithelzellen sowie von dendritischen Zellen und Makrophagen [132]. Bei Mausexperimenten waren hohe Konzentrationen von IL-33 mRNA in Gehirn, Rückenmark, Magen, Lunge und Haut nachweisbar [108, 133].

Die Signaltransduktion von IL-33 bedient sich mehrerer Signalwege (Abb.3). IL-33 fungiert selbst als Zytokin, es wird intrazellulär durch die Caspase-1 aus Pro-IL-33 gespalten, lysosomal verpackt, um mit der Zellmembran zu verschmelzen [134].

Zunächst bindet IL-33 an seinen Rezeptor. Der IL-33-Rezeptor, auch ST2-Rezeptor genannt, ist aus einem Komplex aus ST2L (Transmembran-Domäne) und IL-1RAcP zusammengesetzt. ST2 stellte einen Marker dar, mit dessen Hilfe T<sub>H</sub>2 von T<sub>H</sub>1-Zellen unterschieden wurden [134]. Er wird primär auf T<sub>H</sub>2 Zellen und Mastzellen exprimiert [113], findet sich jedoch auch auf Flimmerepithel sowie auf gespannten Kardiomyozyten [144]. Nach Rezeptorbindung kommt es zur Komplexbildung mit *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) / *MyD88-adaptor-like protein* (MAL). Dadurch kommt es zur Modulation von *interleukin-1 receptor-associated kinase* (IRAK) mit der Folge, dass TRAF6 aktiviert wird. TRAF6 aktiviert sowohl die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) als auch den Inhibitor von NF-κB-Kinase (IKK), wodurch NF-κB freigesetzt werden kann. Freies NF-κB bindet an DNA im Zellkern und fungiert als Transkriptions-Regulatorprotein [134, 135]. Die Modulation von NF-κB durch IL-33 ist komplex: in vitro führt IL-33 bei unstimulierten Fibroblasten und Kardiomyozyten zur Aktivierung von NF-κB während es in Gegenwart von hypertrophen Stimuli zu einer „Abschwächung“ von NF-κB führt. IL-33 phosphoryliert (unabhängig von TRAF6), *extracellular signal-regulated kinase* (ERK 1/2), p38, MAPK und Kinase/c-Jun N-terminus Protein Kinase (JNK). Außer den beiden Signalwegen schlägt IL-33 noch einen dritten Signalweg ein, indem es den Transkriptionsfaktor *activating protein-1* (AP-1) direkt aktiviert [134]. Es bleibt aber unklar, wo genau die Schlüsselpunkte der IL-33-Regulation liegen. Abgesehen vom transmembranären Rezeptor besitzt IL-33 auch einen löslichen extrazellulären Rezeptor *soluble ST2* (sST2). Dieser lösliche Rezeptor ist in vitro in der Lage extrazelluläres IL-33 zu binden und damit

die vorhandene Menge an absolutem IL-33, welches an den ST2-Rezeptor bindet, zu reduzieren. So ist zu erklären, dass sST2 im Gegensatz zu ST2 anti-inflammatorisch wirkt und die  $T_H2$ -Zellen sowie die nachfolgend  $T_H2$ -abhängigen Zytokine IL-4 und IL-5 inhibiert [113, 136, 137]. Schließlich existiert ST2V als eine weitere Isoform des ST2, die insbesondere im Gastrointestinaltrakt vorkommt [138].

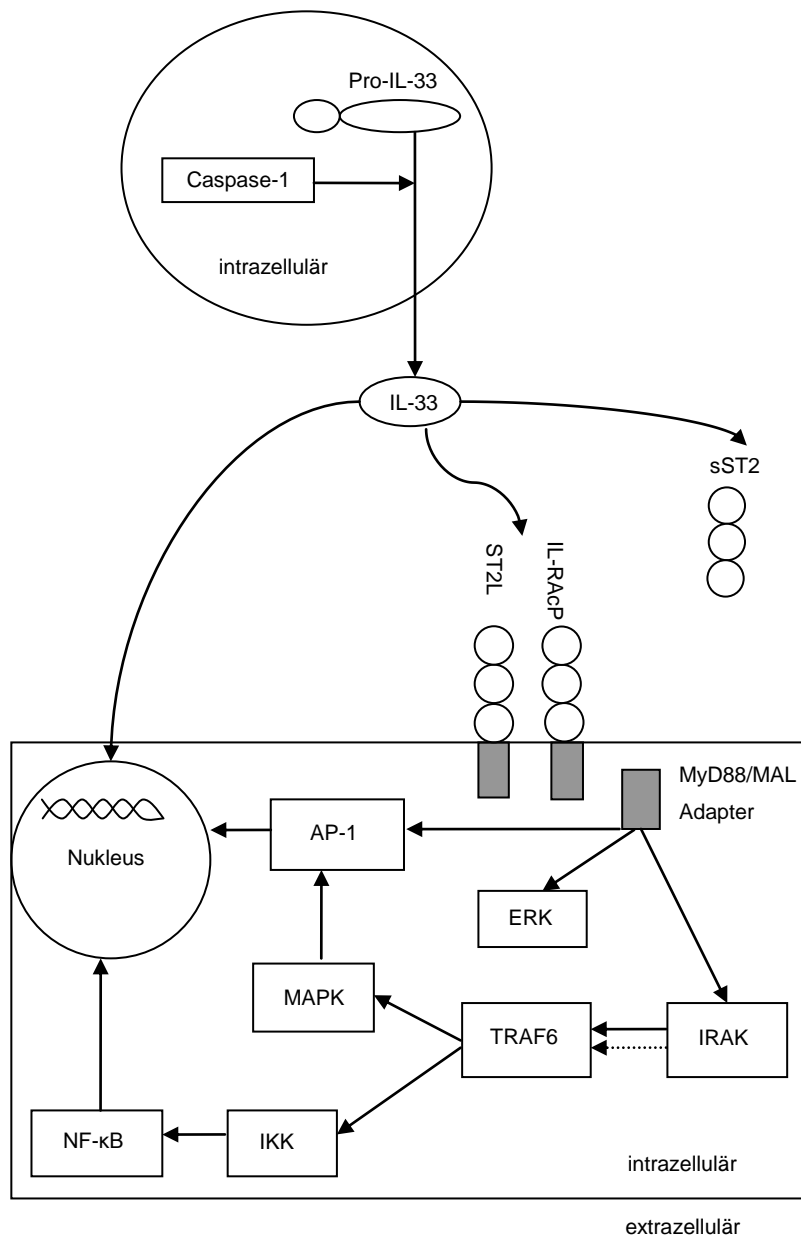


Abbildung 3: Signaltransduktion von IL-33 (in Anlehnung an Kakkar R. [134])

Klinisch von Bedeutung ist Interleukin-33 besonders bei Herzinsuffizienz [134]. Aber auch in Endothelzellen von entzündetem Gewebe bei Rheumatoider Arthritis und Morbus Crohn wurde IL-33 nachgewiesen [139, 140]. In Mausversuchen induzierte IL-33 die T<sub>H</sub>2-abhängige Zytokinexpression und verursachte eine Entzündung in der Lunge und dem Gastrointestinaltrakt von Mäusen [109]. Die Mäuse wiesen eine Splenomegalie, Eosinophilie, erhöhte IgE-Serumspiegel sowie eine erhöhte IL-5 und IL-13-Produktion auf [108]. In glatten Muskelzellen des Respirationstrakts von Asthmatikern wurden erhöhte IL-33-Konzentrationen gefunden [141]. Weiterhin gibt es Hinweise dafür, dass IL-33 als ein frühes Warnsignal in der Entzündung fungiert. Die Tatsache, dass IL-33 in gesunden Gefäßen vorhanden ist, in Tumorgefäßen sowie neugebildeten Gefäßen in der Wundheilung jedoch nicht [142], aber auch der Umstand, dass IL-33 durch TNF, VEGF sowie den Verlust von Zell-Zell-Kontakten vermindert exprimiert wird, sprechen dafür, dass IL-33 wichtig für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion sowie des Zellverbandes ist. In Zellen aus Wundgebieten sinkt die nukleäre IL-33-Konzentration [143]. Dies kommt vielleicht durch die Sekretion von IL-33 durch zerstörte Endothelzellen/Keratinozyten als biologische Barriere von Erregern zustande. Das wäre eine Erklärung für die Gegebenheit, dass die IL-33-Konzentration im Serum sowie in der Colon-Schleimhaut von CED-Patienten erhöht ist. Durch Entzündungsprozesse werden Zellen zerstört, aus denen IL-33 daraufhin freigesetzt wird.

Zusätzlich zur Eosinophilie, Splenomegalie, erhöhten IgE-Serumspiegeln sowie erhöhten IL-5- und IL-13-Sekretionen kommt es in Tierexperimenten nach IL-33-Applikation zu einer Mediahypertrophie sowie zu Leukozyten-Infiltraten unter dem Endothel in der Lunge [108, 145]. Ferner konnte eine verstärkte Expression von IL-33-mRNA in Colon-Epithelzellen von Colitis Ulcerosa Patienten nachgewiesen werden [146, 147]. ST2-Serumlevel sind neben *n-terminal pro brain natriuretic peptide* (NT-proBNP) bei Herzinsuffizienz Patienten erhöht, dabei sind sie bei akuter Dekompensation höher als bei nicht akuter Herzinsuffizienz [148]. Somit hätte die lösliche Form von ST2 das Potential für einen Biomarker für Herzkrankungen. Außerdem sind ST2-Serumkonzentrationen bei Patienten, die im Verlauf an Herzinsuffizienz sterben, höher als bei den Überlebenden, sodass die



ST2-Konzentration ein prognostischer Faktor zu sein scheint [134]. Im Asthmaanfall sind die Serumwerte von ST2 ebenfalls erhöht [149].

## 1.4 CpG-ODN

CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN) sind DNA-Oligonukleotide mit einem hohen Anteil an CpG-Motiven. CpG-ODN ist ein TLR9-Ligand. TLR9 erkennt unmethylierte CpG-Sequenzen in der DNA, die in Bakterien vorkommen. In Menschen liegen CpG-Sequenzen überwiegend methyliert vor [151]. TLR9 wird vor allem in lymphatischen Geweben wie Milz, Lymphknoten, Knochenmark exprimiert, insbesondere auf dendritischen Zellen, Monozyten, NK-Zellen und B-Lymphozyten. Bindet ein Ligand an TLR9, so kann die Signaltransduktion zwei verschiedene Signalpfade einschlagen. TLR9 liegt intrazellulär an endosomale Strukturen gebunden vor. Die Mitglieder der TLR-Familie zeichnen sich alle durch eine intrazelluläre Toll/IL-1-Rezeptor (TIR) - Domäne aus. Sie besitzen zudem eine extrazelluläre Domäne, die sich aus *leucine-rich-repeats* zusammensetzt [152]. Die Signaltransduktion von TLR9 beginnt mit der Interaktion der TIR-Domäne mit dem intrazellulären Adaptermolekül MyD88. Weitere Adaptermoleküle, die bei anderen TLR in Anspruch genommen werden, sind *TIR-domain-containing adaptor protein* (TIRAP/MAL), *TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$*  (TRIF), *TRIF-related adaptor molecule* und der negative Regulator *Sterile  $\alpha$  and HEAT/Armadillo Motive* [153]. Die Adaptermoleküle enthalten ebenfalls TIR-Domänen. Die Bindung von MyD88 führt zur MyD88-abhängigen Aktivierung von IRAK4 und dem Adaptermolekül TRAF6 und mündet schließlich in der Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern. Der zweite Signalpfad führt zur MyD88-abhängigen Aktivierung und Translokation von *interferon regulatory factor 7* [154]. Die Translokation von NF- $\kappa$ B führt zur Transkription von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, TNF, IL-6 und IL-12, die Translokation von *interferon regulatory factor 7* führt zur Synthese von Gruppe-I-Interferonen [155, 156].

Der Oberbegriff CpG-ODN beinhaltet drei Gruppen: CpG-A, CpG-B und CpG-C. CpG-A ist 20-21 Basen lang, besteht aus einer palindromischen CpG-enthaltenden Sequenz und einem Poly-G Schwanz am 5' und 3'-Ende. In Salzlösung bildet es große Aggregate [157]. CpG-B enthält einen ganzen Phosphorothioat-Hauptstrang mit einem oder mehreren CpG-Dinukleotiden und bildet Monomere in Salzlösung [157]. CpG-A induziert IFN- $\gamma$ -Produktion in NK-Zellen, IFN- $\alpha$ -Synthese in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) und führt zur Reifung von Monozyten zu dendritischen Zellen, ist jedoch ein schwacher NF- $\kappa$ B-Aktivator. CpG-B führt vor allem zur B-Zell-Aktivierung und -Proliferation, IgM-Produktion sowie zur Synthese von proinflammatorischen Zytokinen, v. a. IL-6, in Monozyten und B-Zellen. Zudem induziert es in pDC die Synthese von TNF und führt zur Reifung von pDC, stimuliert jedoch nur schwach die IFN- $\alpha$ -Sekretion [158]. Schließlich gibt es noch CpG-C, welches sowohl Funktionen von CpG-A als auch von CpG-B vereint [159]. Es hat einen vollständigen Phosphorothioat-Hauptstrang sowie eine palindromische Sequenz, die mindestens 12 Basen lang ist und mindestens zwei CpG-Dinukleotide enthält. CpG-C aktiviert direkt B-Zellen und führt zu einer starken IFN- $\alpha$ -Produktion in pDC sowie zu deren Reifung. Zudem induziert es stark die Sekretion von IL-12 in pDC. Das macht CpG-C zu potenten T<sub>H</sub>1-Zell-Aktivatoren [157, 158, 160].

## 1.5 p-ERK 42/44 sowie NF- $\kappa$ B p65

ERK-1 und ERK-2, auch p42- und p44-MAPK genannt, gehören zu der Gruppe der MAPK, die in eukaryotischen Zellen vorkommen und für den Ablauf von vielen Zellvorgängen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zelltod, Proteinsynthese sowie Gentranskription zuständig sind. Zu der Gruppe der MAPK gehören außerdem noch die Stress-aktivierte JNK sowie die p38-MAPK. Als drittes Mitglied ist die hier untersuchte extracellular-signal-regulated-kinase (ERK) zu nennen. MAPK werden durch duale Phosphorylierung vom Threonin und Tyrosin der MAPK-Kinasen aktiviert bzw. durch Dephosphorylierung von Proteinphosphatasen deaktiviert. Die MAPK-Kinasen wiederum werden durch Phosphorylierung durch MAPKK-Kinasen aktiviert [161, 162].

Stimuli, welche MAPK aktivieren, sind sehr verschieden, z. B. Umweltfaktoren wie Ischämie, ionisierende Strahlung und osmotischer Schock, Hormone, Zytokine inklusive TNF sowie Wachstumsfaktoren sind beschrieben [161, 163]. ERK1/2 sind, wie schon oben erwähnt, an der Genregulation beteiligt, spielen jedoch auch bei akuten Prozessen wie Inflammation eine Rolle.

NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor. Dieser nimmt eine wichtige Rolle in immunologischen Prozessen, insbesondere bei Entzündungen ein und ist an Vorgängen wie Zelltod und Zellproliferation beteiligt [164]. Bei Säugetieren sind 5 Untereinheiten bekannt, die zur NF- $\kappa$ B/Rel-Familie gehören. Diese sind c-Rel, RelB, RelA (p65), NF- $\kappa$ B1 (p105/p50) sowie NF- $\kappa$ B2 (p100/p52) [165, 166]. Die einzelnen Untereinheiten können untereinander Dimere bilden [167]. Im Ruhezustand liegt NF- $\kappa$ B im Zytosol an inhibitorische  $\kappa$ B-Proteine (I $\kappa$ B) gebunden vor. I $\kappa$ B inhibiert NF- $\kappa$ B durch Bindung an dessen p50-Untereinheit [168]. Es gibt ebenso 5 Gruppen von I $\kappa$ Bs. Die Voraussetzung für die Inhibition von NF- $\kappa$ B durch I $\kappa$ B ist jedoch das Vorhandensein vom Rel-Protein p65 [169]. Ohne p65 kann I $\kappa$ B selbst NF- $\kappa$ B nicht inhibieren. I $\kappa$ B inhibiert über p65 die p50-Untereinheit von NF- $\kappa$ B und hindert p50 an der Dimerisierung und der Translokation in den Zellkern [169]. Wird NF- $\kappa$ B aktiviert, wird I $\kappa$ B phosphoryliert und anschließend im Proteasom abgebaut [164]. NF- $\kappa$ B wird daraufhin freigesetzt, bildet ein Heterotetramer aus zwei Einheiten p50 und zwei Einheiten p65 und kann in den Zellkern wandern, um regulatorische Abschnitte der DNA zu binden. Stimuli, die NF- $\kappa$ B aktivieren sind z. B. LPS, proinflammatorische Zytokine wie TNF oder IL-1, UV-Strahlung, Wachstumsfaktoren, T-Zell- und B-Zellaktivierung sowie virale Infektionen. Gebunden an die DNA reguliert NF- $\kappa$ B dann die Transkription von Zytokinen, Chemokinen, Akute-Phase-Proteinen und Adhäsionsmolekülen [170].

## 1.6 Intestinale Fibroblasten

Fibroblasten sind Zellen mesenchymaler Herkunft. Mesenchymale Zellen lassen sich in mehrere Typen einteilen. Eine Gruppe bilden  $\alpha$ -actin-positive glatte Muskelzellen; eine andere Gruppe, vor allem in der Lamina propria und Submucosa ansässig, stellen die Fibroblasten und Myofibroblasten dar. Diese

besitzen unterschiedlich hohe Anteile an  $\alpha$ -Aktin, Desmin und Vimentin [171]. Fibroblasten sind definitionsgemäß  $\alpha$ -Aktin-negative Zellen, kommen insbesondere im Bindegewebe vor und machen dort den Großteil der Zellen aus. Sie synthetisieren Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Kollagen IV, Laminin- $\beta$ 1 und - $\gamma$ 1 sowie Proteoglykane. Je nachdem, in welchem Kompartiment des Körpers die Fibroblasten ansässig sind, üben sie verschiedene Funktionen aus. Proteine, die von allen Fibroblasten sezerniert werden, sind auch bei der Immunantwort von Bedeutung. Dies sind z. B. proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-8, aber auch Wachstumsfaktoren wie GM-CSF sowie Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 [172, 173]. Abgesehen von den proinflammatorischen Zytokinen synthetisieren Fibroblasten antiinflammatorische und protektive Proteine wie z. B. Fibronektin, TGF- $\beta$ 1 sowie CD40 [174, 175]. Ferner produzieren Fibroblasten konstitutiv Prostaglandin E<sub>2</sub> [176]. Nach der aktiven Phase besitzen Fibroblasten keine Syntheseleistung mehr, verbleiben im Gewebe und heißen dann Fibrozyten. Morphologisch zeichnen sich aktive Fibroblasten durch einen lang gestreckten Zellkern mit viel Euchromatin sowie einen lang gestreckten verzweigten Zellkörper aus. Zudem besitzen sie reichlich raues endoplasmatisches Retikulum, viele Mitochondrien sowie einen stark ausgeprägten Golgi-Apparat, wie es für Zellen mit hoher Syntheseleistung typisch ist. Zu den Funktionen von intestinalen Fibroblasten gehört u. a. die Vorbeugung der Apoptose von T-Lymphozyten durch Sekretion bestimmter Mediatoren [175]. Eine der wichtigsten Funktionen von Fibroblasten ist die Beteiligung an der Wundheilung. Dabei werden Fibroblasten durch Gewebeschäden zu Proliferation angeregt und führen schließlich zur Reorganisation der Wunde. Pathomorphologisch spielen Fibroblasten bei der gestörten Wundheilung, insbesondere bei der Stenoseentstehung im Darm von Morbus Crohn Patienten eine herausragende Rolle [177]. Bei diesem Prozess findet die Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten statt. Zunächst entstehen durch mechanischen Stress aus Fibroblasten Proto-Myofibroblasten, die zytoplasmatische aktinhaltige Stress-Fasern ausbilden. Zudem exprimieren die Proto-Myofibroblasten ED-A Fibronektin auf der Zelloberfläche. Dadurch bekommen die Zellen kontraktile Eigenschaften. Die zusätzliche Einwirkung von TGF- $\beta$  führt schließlich zur Entstehung von reifen Myofibroblasten aus Proto-Myofibroblasten. Diese

zeichnen sich durch Expression von *alpha-smooth muscle actin* und eine noch stärkere kontraktile Eigenschaften als Proto-Myofibroblasten aus [178-180]. Das transiente Vorkommen von Myofibroblasten in einer Wunde ist normal; persistieren diese jedoch, kommt es zur übermäßigen Kollagenablagerung mit Myofibroblastenhyperplasie, Gewebedesorganisation und dadurch zu Fibrose. Genau diese Veränderungen finden sich häufig im Darm von Morbus Crohn Patienten [181, 182].

Wie bereits erwähnt, nehmen auch intestinale Fibroblasten eine zentrale Rolle in der Wundheilung ein. Dazu wandern Fibroblasten mit Hilfe eines chemotaktischen Gradienten aus benachbartem Gewebe in den Entzündungsort ein [183]. Unabdingbar für die Migration ist Fibronektin; weitere chemotaktische Faktoren sind *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), *platelet-derived growth factor* (PDGF-A/B) und *epithelial growth factor* (EGF) [184, 185] TNF und IFN- $\gamma$  dagegen hemmen die Migration von intestinalen Fibroblasten in vitro [184]. Die oben genannten Faktoren sowie *basic fibroblast growth factor* (bFGF), TNF und IL-1 $\beta$  fördern die Proliferation von Fibroblasten [186]. Ferner wirken Entzündungszellen wie Eosinophile, Mastzellen und T-Lymphozyten proliferationsfördernd auf intestinale Fibroblasten [187]. Fibroblasten aus dem Darm von Patienten mit CED proliferieren stärker als die von Kontroll-Patienten. Zudem sezernieren MC-Fibroblasten auch deutlich mehr Kollagen als Kontroll-Fibroblasten [186], was Stenoseentstehung mit Fibrose fördert. Insbesondere TGF- $\beta$ 1 und IGF-1 sind an der Fibroseentstehung beteiligt. Abschnitte vom Darm in Morbus Crohn Patienten mit viel Kollagenablagerung zeigen eine verstärkte Expression von TGF- $\beta$ 1 und IGF-1 [188, 189]. Zudem induzieren diese Mediatoren die Kollagensynthese in vielen mesenchymalen Zellen, ebenso in intestinalen Fibroblasten [190]. Das Migrationspotenzial von Fibroblasten aus dem Darm von Morbus Crohn Patienten ist im Vergleich zu dem aus gesunden Darm vermindert [184].

Fibroblasten exprimieren TLRs und *nucleotide oligomerizing domain-like receptors* (NODs), an die PAMPs binden [183, 191]. Durch die Bindung von PAMPs werden Fibroblasten aktiviert. Die Aktivierung führt über eine Signalkaskade zur Aktivierung von MAPK und zur Translokation von NF- $\kappa$ B. Diese

Signalkaskade endet schließlich in der Sekretion proinflammatorischer Zytokine [192].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Fibroblasten eine zentrale Rolle bei der Entscheidung einnehmen, ob die Integrität der Mukosa bestehen bleibt oder ob es zur Entzündungsreaktion kommt. Dies geschieht durch die Interaktion mit Epithelzellen sowie mit Immunzellen und konsekutiver Sekretion verschiedener Mediatoren. Auch entscheidet die Reaktion der Fibroblasten darüber, ob eine erfolgreiche Wundheilung oder aber eine gestörte Wundheilung abläuft, die dann letztlich zu den gefürchteten Komplikationen mit Entstehung von Fisteln und Stenosen bei Morbus Crohn führt. Intestinale Fibroblasten stellen damit eine für die Pathogenese des Morbus Crohn entscheidende Zellpopulation dar.

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

2-Mercapto-Ethanol	SIGMA-Aldrich, Steinheim
Amphotericin B	PAA, Pasching, Österreich
Bovine Serum Albumin	Biomol, Hamburg
Ciprofloxacin	Bayer, Leverkusen
Complete mini	Roche, Mannheim
Deoxycholsäure	SIGMA-Aldrich, Steinheim
DNase I	Boehringer, Mannheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium, 4,5 g/l Glucose	PAA, Pasching, Österreich
Dulbecco's PBS (1x) (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
ECL-Plus™ Western Blotting Detection Kit	Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
EDTA	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Fetal Calf Serum	PAN Biotech, Aidenbach
Gentamicin	PAA, Pasching, Österreich
Hank's Balanced Salt Solution	PAA, Pasching, Österreich
Hyaluronidase	SIGMA-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kollagenase I	SIGMA-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	SIGMA-Aldrich, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumpyruvat	PAA, Pasching, Österreich
Nicht essentielle Aminosäuren	PAA, Pasching, Österreich

NuPage <sup>®</sup> Antioxidant	NuPage <sup>®</sup> Invitrogen, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
Quantum 333 for Fibroblasts with L-Glutamine	PAA, Pasching, Österreich
Re-Blot Plus Strong Solution (10x)	Chemicon International, Temecula, USA
RPN 800V (Full range Rainbow recombinant protein molecular marker)	Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
Running Buffer MOPS SDS (20x)	NuPage <sup>®</sup> Invitrogen, Carlsbad, USA
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Fluka, Buchs, Schweiz
SDS	Roth, Karlsruhe
TMB Substrate Reagent Set	SIGMA-Aldrich, Steinheim
Transfer Buffer (20x)	NuPage <sup>®</sup> Invitrogen, Carlsbad, USA
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	USB Corporation, Cleveland, USA
Triton-X-100	SIGMA-Aldrich, Steinheim
Trypanblau 0,5 % (w/v)	Biochrom, Berlin
Trypsin (10x)	PAA, Pasching, Österreich
Tween <sup>®</sup> 20	SIGMA-Aldrich, Steinheim

## 2.2 Puffer und Lösungen

ELISA Blockierungs-Lösung (Assay Diluent)	10 % (v/v) FCS in PBS (pH = 7,0)
ELISA Coating Buffer (für IL-6)	0,1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (pH = 9,5)
ELISA Coating Buffer (für IL-8)	0,1 M NaHCO <sub>3</sub> (pH = 8,5)
ELISA Waschpuffer	0,05 % (v/v) Triton-X-100 in PBS (pH = 7,5)



Laemmli 2x	25 % (v/v) Tris 0,5 M 20 % (v/v) Glycerin 40 % (v/v) SDS 10% in dest. H <sub>2</sub> O 1 Spatelspitze Bromphenolblau
RIPA-Puffer	10 % (v/v) Tris 1 M 6 % (v/v) NaCl 5 M 2 % (w/v) Deoxycholsäure 2 % (v/v) Triton-X-100 1 % (v/v) SDS 10% in dest. H <sub>2</sub> O 1 complete mini-Tablette in 1,5 ml dest. H <sub>2</sub> O
Western Blot-Waschpuffer TBST	2 % (v/v) Tris 0,5 M 2 % (v/v) NaCl 5 M 0,1 % (v/v) Tween <sup>®</sup> 20 in dest. H <sub>2</sub> O

## 2.3 Antikörper

Capture Antibody Purified anti-human: Human IL-8 Mab	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Detection Antibody Biotin anti-human: Human IL-8 Biotin Labeled Mab, clone C-IL8-1 (I8-S2),	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Human FGF basic immunoassay	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human IL-1 $\beta$ ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA

Human IL-6 ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Human TGF- $\beta$ 1 ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
IL-1 $\beta$ -AK: Interleukin-1Beta recombinant human (E.coli-derived),	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-8 Standard	R&D Systems, Minneapolis, USA
Monoclonal Anti-human ST2/IL-1 R <sub>4</sub> Antibody, MAB 523	R&D Systems, Minneapolis, USA
Streptavidin-HRP-Conjugat: RPN 4401V	Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
$\beta$ -Actin-Antikörper: MSx Actin, MAB 1501	Chemicon International, Temecula, USA

## 2.4 Stimulanzen

CpG-Oligodeoxynucleotide M362 type C-Human TLR9 ligand 5'- tcg-tcg-tcg-ttc-gaa-cga-cgt-tga t-3'	Invivogen, San Diego, USA
Interleukin-33	R&D Systems, Minneapolis, USA
LPS aus E.coli	SIGMA-Aldrich, Steinheim
TNF	R&D Systems, Minneapolis, USA

## 2.5 Verbrauchsmaterialien

12-Well-Platten: Tissue Culture Plate	Becton Dickinson, Heidelberg
Cellscraper 353043	Corning Inc., Corning, USA
Combitips (2,5 ml, 5 ml, 10 ml)	Eppendorf Biopur <sup>®</sup> , Hamburg

ELISA-96-Well-Platten:	Nunc, Roskilde, Dänemark
Nunc-Immuno 96 MicroWell	
Plate Maxisorb	
Gelkassette: 4-12 % Bis-Tris Gel	NuPage® Invitrogen, Carlsbad, USA
(1,0 mm; 10 well)	
Hyperfilm ECL™ (18 x 24 cm)	Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
Nitrocellulose Membrane Filter	NuPage® Invitrogen, Carlsbad, USA
(0,45 µm Pore Size)	
Petrischalen: Corning 430167	Corning Inc., Corning, USA
100 mm x 20 mm	
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning Inc., Corning, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen:	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon® 352070 (50 ml)	
Falcon® REF 352096 (15 ml)	
Whatman-Papier	NuPage® Invitrogen, Carlsbad, USA
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> ):	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon® 353081	

## 2.6 Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoreseapparatur:	NuPage® Invitrogen, Carlsbad, USA
X Cell Sure Lock™, Novex Mini Cell	
ELISA-Reader:	MWG-Biotech, Denkendorf
Fusion Precision Microplate	
Reader	
Feinwaage MC1 LC6200S	Sartorius, Göttingen

Hypercassette	Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Mikroskop S21665	Leica Microsystems, Bensheim
Millipore Wasserfiltrationsanlage Milli-Q	Millipore, Billerica, USA
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer (0,100 mm / 0,0025 mm <sup>2</sup> )	Optik Labor, Friedrichsdorf
pH-Meter	Schott AG, Mainz
Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten: P1000, P200, P100, P20	Eppendorf, Hamburg
Schüttelgerät KS 260 basic	IKA-Labortechnik Janke & Kunkel, Staufen
Spannungsquelle: Power Ease® 500 Power supply	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sterilbank: Lamin Air® HB 2448	Heraeus, Hanau
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	IKA-Labortechnik Janke & Kunkel, Staufen
Wärmethermostat	LAUDA, Lauda-Königshofen
XCell II	NuPage® Invitrogen, Carlsbad, USA
Zentrifugen:	
- Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
- Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
- Mikro	G. Kisker, Mühlhausen
- Multifuge 3S-R	Heraeus, Hanau

## **2.7 Software**

Microsoft Excel 2010

SigmaPlot 11.0

SoftMax

Microsoft, Redmond, USA

Systat Software, Erkrath

MDS Analytical Technologies,

Mississauga, Kanada

## 3 Methoden

### 3.1 Zellexperimentelle Methoden

Die verwendeten primären Fibroblasten wurden in Quantum 333 mit L-Glutamin kultiviert. Quantum 333 ist ein spezielles Nährmedium für Fibroblasten. Es enthält Serumkomponenten, Wachstumsfaktoren, Spurenelemente und Insulin. Zudem enthält Quantum 333 ein eisenbindendes Molekül, welches die zelluläre Eisenaufnahme fördert. Da keinerlei Serumkomponenten mehr zugefügt werden müssen, herrschen bei Verwendung dieses Nährmediums stets gleiche, reproduzierbare Stimulationsbedingungen.

Für die Stimulation wurde *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) verwendet. DMEM ist eine Abwandlung des *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM), enthält jedoch mehr Glucose, Aminosäuren und Vitamine als EMEM und ist deshalb auf Zellen mit einem hohen Energiebedarf abgestimmt. Vorteil von DMEM ist, dass es ein Stimulationsmedium ohne *fetal calf serum* (FCS) ist. Da FCS selbst eine Menge Zytokine enthält, würden diese bei den späteren *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) - Messungen die Ergebnisse verfälschen. Außerdem müssen die Fibroblasten durch die FCS-Abwesenheit „hungern“ und lassen sich deshalb besser stimulieren. Allen Medien wurden 5 ml Penicillin/Streptomycin, 2 ml Ciprofloxacin und 500 ml Amphotericin B zugesetzt. DMEM wurden zusätzlich 5 ml Nicht-essentielle-Aminosäuren und 5 ml Natrium-Pyruvat beigelegt.

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden an einer Sterilbank durchgeführt. Für die Experimente wurden *colonic lamina propria fibroblasts* (CLPF) verwendet. Diese Fibroblasten stammen aus der Mukosa von Morbus Crohn Patienten mit Stenosen und ohne Stenosen. Die Zellen von Kontroll-Patienten wurden aus Biopsien und Resektaten gewonnen. Die Biopsien wurden im Rahmen einer Koloskopie aus gesunden Mucosa-Arealen entnommen. Die Fibroblasten aus den Resektaten stammten von operierten Patienten, bei denen eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung ausgeschlossen werden konnte.

Während die Zellen, die aus Biopsien stammten, direkt isoliert wurden, mussten die Zellen aus den Resektaten schrittweise isoliert werden. Dazu wurden die Resektate zunächst in 1 mm lange Stücke geschnitten. Die zurechtgeschnittenen Mucosastücke wurden in *Hank's Balanced Salt Solution* ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  mit 2 mmol/l Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 30 Minuten lang bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. In diesem Schritt lösten sich die Epithelzellen vom Gewebe ab und wurden anschließend verworfen. Danach wurden die Resektatstücke in 1 mg/ml Kollagenase I, 0,3 mg/ml DNase I und 2 mg/ml Hyaluronidase in *phosphate buffered saline* (PBS) bei 37 °C 30 Minuten lang unter Schütteln aufgeschlossen. Der Überstand wurde verworfen und FCS-haltiges Medium hinzugefügt, um den Verdau zu stoppen. Schließlich wurden die Zellen in Zellkulturflaschen überführt oder eingefroren. Wenn die Zellen Konfluenz erreichten, wurden sie zum Weiterkultivieren in Petrischalen überführt [185, 193].

Die Fibroblasten wurden in einem Brutschrank bei 10 %iger  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre, 95 %iger Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde durch regelmäßiges Betrachten im Lichtmikroskop kontrolliert und in Abhängigkeit vom Wachstum wurden die Zellen alle zwei bis vier Tage mit jeweils 10 ml frischem Quantum 333 pro Petrischale versorgt. Sobald die Zellen dicht genug gewachsen waren und mindestens 95 % der Oberfläche bedeckten, wurden sie im Verhältnis von 1 : 3 geteilt. Bis zum Erreichen der Konfluenz vergingen ca. zwei bis drei Wochen. Die Fibroblasten wurden bis zum Teilungsstadium 8 kultiviert und in den Teilungsstadien drei bis sechs für die Stimulationsexperimente verwendet (Abb. 4).

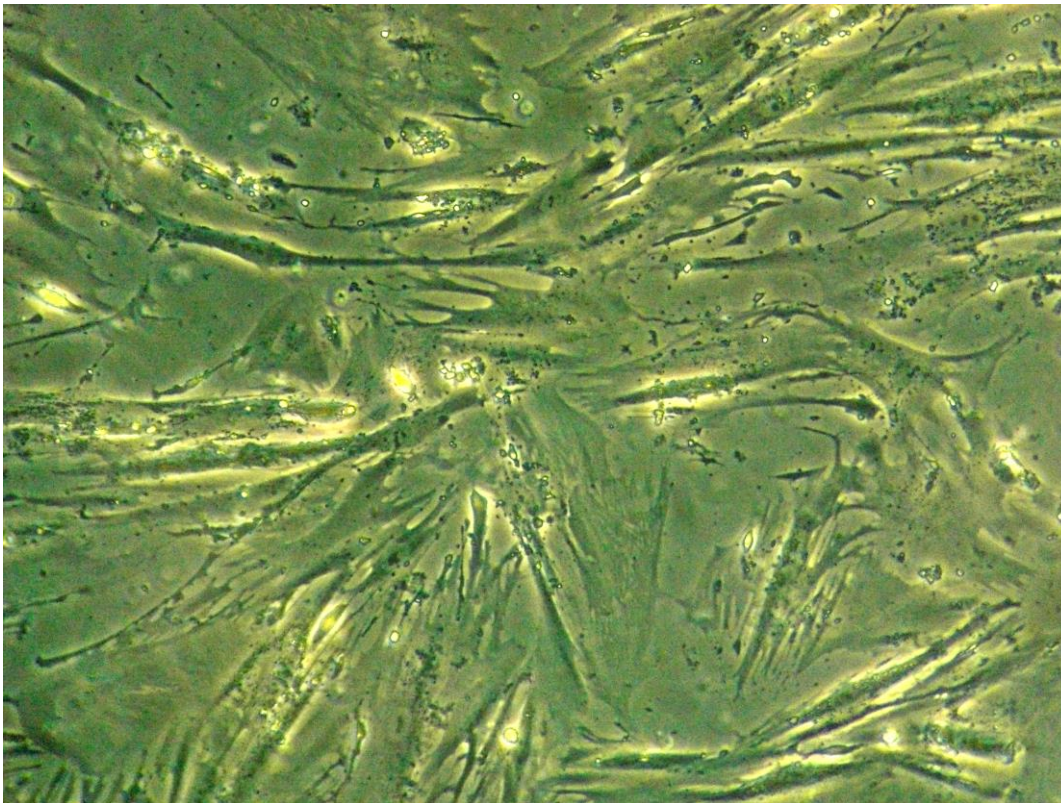


Abbildung 4: Kontroll-CLPF in Kultur

Dafür wurde zunächst das Nährmedium mit Glaspipetten abgesaugt und jede Petrischale einmal mit PBS gespült. Im nächsten Schritt wurden die Fibroblasten auf dem Boden der Petrischale mit ca. 1,5 ml 0,5 %igem Trypsin (in PBS) pro Schale versetzt und für ungefähr 20 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Durch Klopfen auf den Schalenboden wurde die Ablösung der Zellen beschleunigt. Sobald die Zellen sich abgelöst hatten, wurde jede Schale mit ca. 5 ml Quantum 333 gespült und resuspendiert, um auch letzte festsitzende Zellen mechanisch zu lösen. Die gesamte Suspension wurde in ein Falcon<sup>®</sup>-Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei 24 °C und 1800 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde mit frischem Quantum 333 resuspendiert und im Verhältnis 1 : 3 auf neue Petrischalen aufgeteilt. Jede Petrischale wurde mit jeweils 10 ml Quantum 333 versetzt und zur weiteren Kultivierung in den Brutschrank gestellt.



## 3.2 Versuchsplanung

### 3.2.1 Untersuchung der Zytokinantwort nach Stimulation

Die Stimulationsexperimente wurden in doppelter Anordnung gleicherweise mit Morbus-Crohn-Zellen, Morbus-Crohn-Stenose-Zellen und Kontroll-Zellen durchgeführt um Unterschiede im Reaktionsverhalten zu untersuchen. Alle Stimulationsbedingungen wurden ebenfalls doppelt durchgeführt. Für die Stimulationsexperimente wurden MultiWell-Platten verwendet. Alle *Wells* wurden mit einer gleichen Anzahl an Zellen versehen und unterschiedlich stimuliert, um den Einfluss der einzelnen Stimulanzen auf die Zytokinproduktion (IL-6 und IL-8) zu untersuchen. In jedem Experiment wurden jeweils zwei *Wells* nicht stimuliert (Negativ-Kontrolle). Die übrigen *Wells* wurden jeweils unterschiedlich stimuliert. In einem Experiment wurden die Zellen mit TNF, CpG-ODN und LPS (Positivkontrolle) stimuliert. In einem anderen Experiment wurden die Fibroblasten mit steigenden Konzentrationen an IL-33 stimuliert. Weiterhin folgten Experimente, in denen die Fibroblasten mit steigenden Konzentrationen an IL-33 zusammen mit LPS in einer konstanten Konzentration kostimuliert wurden. Schließlich wurden Kostimulationsexperimente durchgeführt, in denen mit IL-33 und TNF sowie IL-33 und CpG-ODN in einer konstanten Konzentration stimuliert wurde. 24 h und 48 h nach Stimulation wurden die Zellüberstände entnommen und per ELISA die Zytokine in den Überständen gemessen.

### 3.2.2 Stimulationsversuch

Zunächst mussten die Zellen gezählt werden, um die benötigte Anzahl anschließend in den Experimenten einzusetzen. Dafür wurden die Zellen wie beim Teilungsvorgang behandelt. Zur Zählung wurden sie nach dem Abzentrifugieren in 5 ml Quantum 333 aufgenommen und resuspendiert. Im ersten Schritt wurden 100 µl der in Quantum 333 verdünnten Zellsuspension in ein *Well* der 96-Well-Platte überführt. Daraufhin wurden 10 µl aus den 100 µl Zellsuspension entnommen und mit 10 µl Trypanblau in einem *Well* einer 96-Well Platte gemischt. 10 µl dieses Gemisches wurden auf eine Neubauer Zählkammer

aufgetragen. Trypanblau reichert sich in geschädigten Zellmembranen an, intakte Zellen dagegen bleiben farblos. Die ungefärbten intakten Zellen wurden in allen vier Quadranten gezählt, anschließend wurde die Zellzahl unter Berücksichtigung der Verdünnung und des Kammervolumens ermittelt.

Die Zellen wurden in MultiWell-Platten ausgesät. Ein *Well* enthielt 50.000 Zellen. Im ersten Schritt wurde jedes *Well* mit jeweils 1 ml Zellsuspension befüllt. Die Zellen in den *Wells* wurden über Nacht im Brutschrank belassen, um sicherzustellen, dass sich alle Zellen am *Well*-Boden festgesetzt haben. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und die sich bereits festgesetzten Zellen wurden für mindestens 8 Stunden auf DMEM umgesetzt. Im nächsten Schritt erfolgte die Stimulation. Zuerst wurde DMEM wieder abgesaugt und durch jeweils 1 ml frisches DMEM ersetzt. Gleich darauf wurden die Stimulanzien in den entsprechenden Konzentrationen in die *Wells* gegeben und mit DMEM gut durchmischt. Abschließend wurde die MultiWell-Platte leicht geschwenkt und dann in den Brutschrank gestellt.

Die Überstandabnahme erfolgte nach 24 h und nach 48 h. Nach 24 h wurden aus jedem Stimulationswell 250-300 µl Überstand nach mehrmaligem auf- und abpipettieren entnommen und in Eppendorf Cup (1,5 ml) überführt. Auf die gleiche Art wurden die restlichen 700-750 µl Überstand nach 48 h entnommen. Die Überstände wurden bei -20 °C im Gefrierfach aufbewahrt.

Für die Zelllysatherstellung wurde zunächst das Quantum 333 in den Petrischalen der adhärennten Zellen abgesaugt, anschließend wurden diese mit 1,5 ml Trypsin versetzt und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die gelösten Zellen wurden mit 5 ml Zellkulturmedium mehrmals resuspendiert und in einem Falcon®-Röhrchen für 10 min bei 1800 rpm abzentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte die Zugabe von 100 µl RIPA-Lyse-Puffer und die Überführung in ein Eppendorf-Cup. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Eppendorf Cups nochmals bei 13000 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Abschließend wurde das DNA-Pellet aus dem Lysat verworfen. Das entstandene Lysat wurde bei -20 °C aufbewahrt.

Neben den beschriebenen Zelllysaten aus unstimulierten CLPF erfolgte ebenfalls eine Zelllysatherstellung aus stimulierten CLPF. Dazu wurden die adhärenenten Zellen nach erfolgtem Stimulationsversuch in der MultiWell-Platte mit 1 ml eiskühlem PBS versetzt. Dann wurden die Zellen mechanisch vom Boden der MultiWell-Platte mit einem *Cellscraper* abgeschabt. Die abgelösten Zellen in PBS wurden durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und dann in ein Eppendorf Cup überführt. Bei 13000 rpm und 4 °C wurden die Zellen im Eppendorf Cup kurz abzentrifugiert. PBS wurde verworfen und das Zellpellet mit 100 µl RIPA-Puffer versetzt und durch erneutes Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Das anschließende Vorgehen war analog dem bei der allgemeinen Zelllysatherstellung.

Die hergestellten Zelllysate wurden für Western Blots verwendet. Voraussetzung dafür war eine bekannte Proteinkonzentration dieser Lysate. Die Proteinkonzentration wurde mittels eines BCA-Protein-Assays bestimmt. Zuerst wurden die bei Raumtemperatur aufgetauten Proben auf dem Vortexer gemischt. 10 µl der Proben, des Standards und des Leerwerts wurden dann in die zugehörigen *Wells* einer 96-Well-Platte pipettiert. Als Leerwert wurde reiner RIPA-Lyse-Puffer verwendet. Der Standard bestand aus einem Gemisch aus RIPA-Lyse-Puffer und *bovine serum albumin* (BSA) [2mg/ml]. Die niedrigste Standardkonzentration betrug 200 µg/ml, die höchste 2000 µg/ml. Die ersten 2 Spalten der 96-Well-Platte wurden für den Standard verwendet. Auch hier wurden wie beim gewöhnlichen ELISA Doppelmessungen durchgeführt. Dann wurde das *working reagent* vorbereitet. Dafür wurden Bicinchoninic Acid und *Copper-II-sulphate pentahydrate 4 % solution* in einem Verhältnis von 50:1 gemischt. Anschließend wurden 200 µl des *working reagent* in jedes Well hinzugefügt. Die Platte wurde nach 30 Sekunden Schütteln 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur konnten die Absorptionswerte im ELISA-Reader bei 450 nm und 540 nm gemessen werden.

### 3.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine biochemische Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen innerhalb eines Proteingemisches. Zur Detektion gibt es verschiedene Möglichkeiten; der Immunoblot zum Beispiel basiert auf der Tatsache, dass Antigen und Antikörper miteinander interagieren. Dabei erfolgt die Detektion mittels Antikörpern, indem diese an bestimmte Epitope von Antigenen in den Proteinen binden, welche durch das Blotten auf eine Membran transferiert werden.

#### 3.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung eines Proteingemisches gibt es verschiedene Verfahren. Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine ihrer Molekularmasse nach im elektrischen Feld aufgetrennt.

SDS (Natriumdodecylsulfat), ein Monoester der Schwefelsäure, ist ein anionisches Detergens, welches an Proteine im Verhältnis von 1,4 : 1 bindet, dem Proteingemisch durch sein Sulfatanion eine negative Ladung verleiht und damit die ursprüngliche Proteinladung maskiert. So können die negativ geladenen Proteine das Gel Richtung Anode durchlaufen und die Durchlaufgeschwindigkeit ist nur noch ihrem Molekulargewicht proportional. Parallel dazu läuft ein Proteingemisch bekannter Molekularmasse als Marker mit, der dazu dient, die Molekularmassen der unbekannten Proteinproben ermitteln zu können.

Nachdem die Proteinkonzentrationen zuvor mittels BCA-Assay bestimmt wurden, erfolgte die Probenvorbereitung anhand eines Pipettierplans. Zunächst wurden die Proben und der Marker auf Eis aufgetaut. Die Proben wurden mit Wasser und Laemmli-Puffer gemischt. Es wurde ein maximales Taschenvolumen von 40 µl veranschlagt. Die 40 µl setzten sich aus 33,3 µl Probe und H<sub>2</sub>O sowie 6,7 µl Laemmli-Puffer zusammen, um die gleiche Proteinkonzentration pro Laufspur auf dem Gel zu gewährleisten. Das im Laemmli-Puffer enthaltene SDS führt zur Proteindenaturierung, indem es nichtkovalente Bindungen im Protein bricht und damit die Sekundär-, Tertiär- und die Quartärstruktur des Proteins zerstört.

Zusätzlich enthält der Laemmli-Puffer 2-Mercaptoethanol, das den Denaturierungsprozess unterstützt, indem Disulfidbrücken reduziert und damit gespalten werden. Das im Laemmli-Puffer vorhandene Glycerin diente dazu, das Absinken der Proben in den Geltaschen zu erleichtern. Die gemischten Proben wurden kurz mit dem Vortexer gemischt und anschließend für fünf bis zehn Minuten bei 95 °C unter leichtem Schütteln im Thermomixer denaturiert. Bei diesem Vorgang werden Wasserstoffbrückenbindungen gebrochen. Danach kamen die Proben auf Eis, um anschließend 1 Minute lang bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert zu werden und wieder auf Eis gestellt zu werden. 10 µl des Markers und je 40 µl der Proben wurden in die jeweiligen Taschen des Gels einer Gelkassette langsam einpipettiert.

Mittels Elektrophorese wurden die Proteingemische dann aufgetrennt. Dafür wurde eine Elektrophoresekammer verwendet. Als Gel diente ein 4-12 %iges NuPage® Gel. Die Gelkassette wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die äußere und innere Kammer wurden mit Laufpuffer gefüllt, anschließend wurde der Kamm aus dem Gel entfernt, um ein Beladen der Geltaschen zu ermöglichen. Die Elektrophoresekammer wurde an die Stromquelle angeschlossen. Bei 160-180 V und 90 mA wurden die Proben dann ca. 1,5 Stunden lang Richtung Anode aufgetrennt.

### **3.3.2 Nass-Transfer**

Nachdem die Proben das Gel durchlaufen haben, erfolgte der Transfer auf eine Membran. Dies ist notwendig, weil die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine den folgenden Antikörpern im Gel nicht zugänglich sind. Die Gelkassette wurde unter Zuhilfenahme eines Spatels aufgebrochen und das fertige Gel in das Blot-Modul eingebaut. Dabei wurde der Blot vom Plus- zum Minuspol folgendermaßen aufgebaut: 2 Schwämmchen, darauf das Filterpapier, darauf die Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,45 µm), dann das Gel, anschließend wieder Filterpapier und zum Schluss wieder 2 Schwämmchen. Sowohl die Schwämmchen als auch die Membran und das Filterpapier wurden zuvor in Transferpuffer getränkt. Die Transferkammer wurde so in den Elektrophoresetank eingesetzt, und beides

wurde mit Transferpuffer aufgefüllt und bei 300 V und 220 mA für 1,5 Stunden an die Stromquelle angeschlossen.

### 3.3.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Der Immuno-Blot ist eine Methode, die dazu dient, auf eine Nitrocellulosemembran transferierte Proteine durch Antikörperbindung sichtbar zu machen. Das kann mittels direktem oder indirektem Nachweisverfahren erfolgen.

Der immunologische Nachweis erfolgte mittels indirekter Nachweismethode. Hierbei wird ein spezifisch gebundener Antikörper durch einen gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper, welcher seinerseits an ein Enzym gekoppelt ist, nachgewiesen.

Dazu wurde eine Nitrocellulosemembran zunächst nach dem Blotten abhängig vom Primär-Antikörper eine Stunde lang mit 10 ml 5 %iger Magermilch oder 5 %igem BSA unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Anschließend wurde die Membran 3x kurz mit *tris buffered saline* (TBST) gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper, der je nach Datenblatt in Magermilch oder in BSA verdünnt wurde. Die Membran wurde 1 Stunde lang unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht mit dem Primär-Antikörper inkubiert. Danach wurde sechsmal 10 min lang mit TBST gewaschen, um unspezifische Antikörperbindungen zu entfernen. Nachfolgend wurde die Membran mit dem Sekundär-Antikörper, einem *horse radish peroxidase* (HRP) - konjugierten Antikörper 1:3000 in Magermilch bzw. BSA verdünnt und für 1 Stunde lang bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte wieder sechsmal 10 min Waschen mit TBST, um ungebundene Sekundär-Antikörper zu entfernen.

Schließlich wurde die Membran zur Detektion auf Frischhaltefolie ausgelegt und mit 3 ml ECL-Plus für 5 min versetzt. Die Meerrettichperoxidase, die an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, oxidiert das Substrat Lumigen PS-3 zu einem Acridiniumester. Durch Reaktion mit Peroxiden entsteht eine Chemilumineszenz

mit einem Emissionsmaximum bei 430 nm. Danach wurde die Membran zusammen mit einem Film (Hyperfilm-ECL) in eine Filmkassette (Hypercassette) eingelegt und in der Dunkelkammer entwickelt, wobei die Expositionszeit des Films mit der Membran von der aufgetragenen Proteinmenge und vom verwendeten Antikörper abhängig waren und von 5 Sekunden bis 10 min betragen hat.

### 3.3.4 Stripping

Nach einem abgeschlossenen Western Blot kann man die Nitrocellulosemembran immer noch verwenden, um andere Antikörperbanden nachzuweisen. Dafür bedient man sich des *Stripping*. So kann man einen erneuten Western-Blot-Lauf vermeiden. Zunächst muss man die bereits gebundenen spezifischen Antikörper auf der Membran entfernen, um die neuen Antikörper binden lassen zu können. Im ersten Schritt wurde die vorher in TBST gewaschene Membran mit ca. 10 ml *Re-blot-Plus Strong Solution* (1:20 in TBST verdünnt) für 15 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran gewaschen. Beim Waschvorgang wurde die *Re-blot-Plus Strong Solution* ausgeschüttet, die Membran mit TBST benetzt und für 10 min auf den Schüttler gestellt, um anschließend das TBST wieder zu verwerfen und durch neues zu ersetzen. Dieser Vorgang wurde dreimal vollzogen. Im letzten Schritt musste die Membran 1 Stunde lang mit 5 %iger Magermilchlösung (in TBST gelöst) blockiert werden, bevor neue Antikörper folgen konnten.

### 3.3.5 $\beta$ -Actin-Ladungskontrolle

Die  $\beta$ -Actin-Ladungskontrolle wird nach einem Western Blot durchgeführt, um sicherzustellen, dass alle Geltaschen auch gleichmäßig beladen worden sind. Ist dies nicht der Fall, kann eine Beurteilung der Banden auf dem Blot nicht vorgenommen werden. Bei der Durchführung wurde als erstes die Membran *gestrippt* und anschließend 1 Stunde lang mit Milchlösung blockiert. Danach erfolgte ein kurzes Waschen der Membran mit TBST. Dann wurde die Membran

mit dem Anti- $\beta$ -Actin-Antikörper (1:10000 in Milchlösung verdünnt) 45 min lang bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte sechsmal 10-minütiges Waschen der Membran mit TBST, um im Anschluss darauf den Sekundär-Antikörper Anti-mouse-HRP (1:3000 in Milchlösung verdünnt) 45 min lang auf der Membran zu belassen. Nach sechs weiteren Waschvorgängen erfolgte die Inkubation mit ECL-Plus und der Film konnte mit der Membran entwickelt werden. Die Belichtungszeit betrug eine bis fünf Minuten.

### **3.4 Enzyme-linked immunosorbent assay**

#### **3.4.1 Allgemeines Prinzip**

Zur quantitativen Bestimmung der Zytokine in den Zellüberständen wurde ein ELISA durchgeführt. Um bestimmte Proteine mittels ELISA nachzuweisen, werden die Lösungen, in denen die nachzuweisenden Proteine enthalten sind direkt bzw. indirekt an eine Mikrotiterplatte gebunden. Man bedient sich spezifischer *Detection*-Antikörper, die mit einem Enzym markiert sind, um die Proteine nachzuweisen. Die *Detection*-Antikörper binden an spezifische Epitope der nachzuweisenden Proteine und durch die Zugabe eines spezifischen Enzymsubstrates kommt es zu einer biochemischen Reaktion, bei der Farbe freigesetzt wird. Dabei lässt sich von der Farbintensität auf die an der Mikrotiterplatte gebundene Antikörpermenge schließen. Monochromatisches Licht der Wellenlänge des Absorptionsmaximums des entstandenen Produktes misst im Photometer die Transmission nach Farbreaktion. Daraufhin wird diese in die Absorption umgerechnet.

#### **3.4.2 Bestimmung von Interleukin-6 und Interleukin-8**

Interleukin-6 und Interleukin-8 wurden mittels indirektem ELISA gemessen. Zunächst wurde eine MultiWell-Platte über Nacht gecoatet. Dazu wurden 100  $\mu$ l einer Lösung von 10  $\mu$ g/ml (IL-6) bzw. 2  $\mu$ g/ml (IL-8) Capture antibody in Coating Buffer in jedes Well pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als nächstes



wurde die Lösung mit den nicht gebunden Coating-Antikörpern mittels drei Waschvorgängen aus der Platte entfernt, hierzu wurden alle Wells mit 300 µl Waschpuffer befüllt, um anschließend wieder entleert zu werden und durch Klopfen der Mikrotiterplatte gegen eine Unterlage alle ungebundenen Proteine zu entfernen. Im nächsten Schritt erfolgte die Blockierung von ungebundenen Proteinbindungsstellen. Dazu wurde jedes Well mit 200 µl Blockierungslösung bestehend aus 10 % (v/v) FCS in PBS befüllt und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur belassen. Nach dem Blockieren erfolgte dreimal erneutes Waschen und anschließend wurden 100 µl der jeweiligen Zellüberstände auf die Platte aufgetragen und für zwei Stunden (IL-6) bzw. eine Stunde (IL-8) inkubiert. Danach erfolgten drei weitere Waschschritte. Als nächstes wurde der working detector vorbereitet. Dieser besteht aus Detection-Antikörper und Enzym Streptavidin-HRP, die jeweils im gleichen Verhältnis wie der Coating-Antikörper in Assay-diluent verdünnt wurden. Die Wells wurden mit 100 µl working detector beschichtet und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem letzten Waschschritt wurden 100 µl 3,3'und 5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Substrate Reagent aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Schließlich wurde die Reaktion mit 50 µl/Well 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und letztendlich konnte im ELISA-Reader bei 450-540 nm die Absorption gemessen werden.

### 3.5 Statistik

Bei allen Versuchen sind die Ergebnisse der Stimulationsexperimente als Mittelwerte (MW) angegeben. Für die statistische Analyse wurde für die Zytokin-konzentrationen der *Mann-Whitney-Rank-Sum-Test* verwendet. Damit konnte auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen und der Kontrolle geprüft werden. \* zeigt die statistische Signifikanz mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$ .

Sämtliche statistischen Analysen wurden mit dem Programm Sigmaplot, Version 11, für Windows durchgeführt.

Bei allen Versuchen wurden im ELISA sowohl für untersuchten Überstand als auch für Standard und Leerwert mindestens Duplikate aufgetragen und diese jeweils gemittelt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ziele

In einem ersten Schritt wurden zunächst Substanzen, die bekannterweise eine Zytokinantwort bei Fibroblasten induzieren können zur Stimulation verwendet [194-200]. Diese Substanzen sind TNF, LPS aus E.coli sowie CpG-ODN (M362). Ziel war die Etablierung einer Positivkontrolle, wobei folgende Fragen in diesem ersten experimentellen Ansatz beantwortet werden sollten:

1. Unter welchen experimentellen Bedingungen reagieren Kontroll (KO) - CLPF auf diese Stimulanzen mit einer optimalen IL-6- und IL-8-Sekretion?
2. Reagieren auch Morbus Crohn (MC) - CLPF und Morbus-Crohn-Stenose (MCS) - CLPF unter den gewählten Bedingungen auf diese Stimulanzen mit einer IL-6- und IL-8-Sekretion?
3. Bestehen Unterschiede zwischen der Zytokinsekretion der stimulierten MC-CLPF und der Zytokinsekretion der KO-CLPF?

Aufbauend auf diesen Vorarbeiten, soll im Rahmen dieser Arbeit der Effekt des bisher wenig untersuchten Zytokins IL-33 auf die Induktion von IL-6 und IL-8 bei KO-, MC- und MCS-CLPF untersucht werden. Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

4. Bewirkt IL-33 bei KO-CLPF eine dosis- sowie zeitabhängige Modulation der IL6-/IL-8-Sekretion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle?
5. Reagieren MC-CLPF und MCS-CLPF unter den jeweiligen Bedingungen auf IL-33 mit einer IL-6/IL-8-Sekretion?
6. Gibt es Unterschiede zwischen der Zytokinsekretion der stimulierten KO-CLPF, MC-CLPF und MCS-CLPF?

## **4.2 Morphologische Unterschiede der CLPF**

Die verwendeten KO-CLPF wuchsen zum Großteil schnell und adhärent, während alle verwendeten MC-CLPF deutlich langsamer proliferierten und zum Teil keine Adhärenz erreichten. Zudem war die Kultivierung von MC-CLPF schwierig, weil diese oftmals bereits nach dem Auftauen oder aber in den ersten Teilungsstadien stark zu einem Pilzbefall neigten. Die Morphologie dieser Fibroblasten imponierte unter dem Lichtmikroskop unterschiedlich und reichte von schmalen, langgezogenen Zellformen bis hin zu breiten, spiegeleiförmigen Formen, welche ein langsames Wachstum als die schmalen aufwiesen. Die Kultivierung von MCS-CLPF erwies sich einfacher als die von MC-CLPF. Sie wuchsen ähnlich schnell wie KO-CLPF, allerdings waren die Stenose-Fibroblasten morphologisch auffällig schmal und länger als die beiden anderen Zellisolate.

### 4.3 Charakterisierung der Stimulierbarkeit von CLPF bezüglich verschiedener TLR-Liganden und TNF

#### 4.3.1 Stimulation von KO-, MC- und MCS-CLPF mit TNF

IL-6-Antwort nach 24 h und nach 48 h

Bei der Untersuchung der Interleukin-6-Sekretion (Abb. 5) in den Zellüberständen der KO-, MC- und MCS-CLPF nach Stimulation mit TNF wurden signifikante Unterschiede zwischen allen drei Positivkontrollen und der unstimulierten Negativkontrolle gefunden. TNF stimuliert in allen drei CLPF-Gruppen die IL-6-Sekretion nach 24 h und nach 48 h. Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen CLPF-Gruppen feststellen.

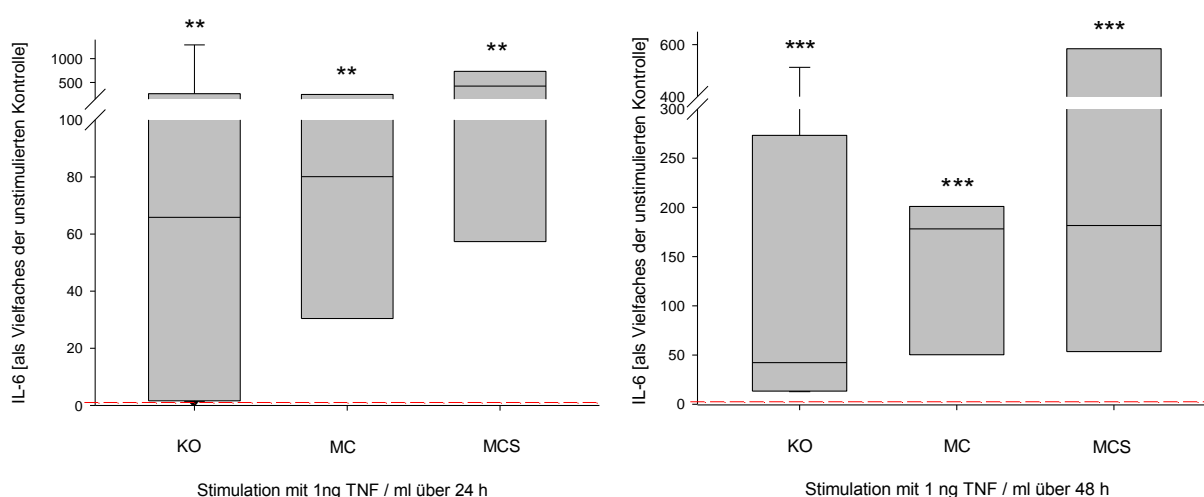


Abbildung 5: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der KO-, MC-, MCS-CLPF mit TNF

KO- (n=14), MC- (n=6) und MCS-CLPF (n=7) wurden mit TNF (1 ng/ml) stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h (linke Abbildung) und nach 48 h (rechte Abbildung) abgenommen und mittels ELISA die IL-6-Konzentration untersucht. Dargestellt ist der Anstieg der Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

## IL-8-Antwort nach 24 h und nach 48 h

Bei der Untersuchung der Interleukin-8-Gesamtmenge nach 24 h und 48 h (Abb. 6) in den Zellüberständen der KO-, MC- und MCS-CLPF nach Stimulation mit TNF wurden signifikante Unterschiede zwischen allen 3 Positivkontrollen und der unstimulierten Negativkontrolle gefunden. TNF stimuliert bei KO-, MC- und MCS-CLPF ähnlich wie die IL-6- auch die IL-8-Sekretion nach 24 h und nach 48 h. Analog zur IL-6-Antwort gibt es keine Unterschiede im Reaktionsvermögen der einzelnen CLPF-Gruppen untereinander.

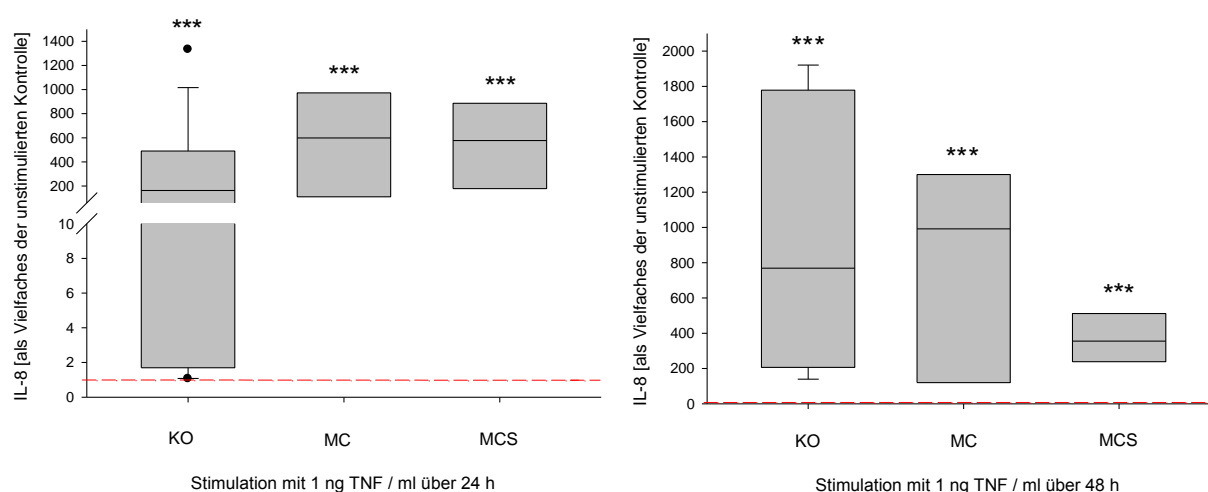


Abbildung 6: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der KO-, MC, MCS-CLPF mit TNF

KO- (n=14), MC- (n=6) und MCS-CLPF (n=7) wurden mit TNF (1 ng/ml) stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h (linke Abbildung) und nach 48 h (rechte Abbildung) abgenommen und mittels ELISA die IL-8-Konzentration untersucht. Dargestellt ist der Anstieg der Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

### 4.3.2 Stimulation von KO-, MC- und MCS-CLPF mit LPS

#### IL-6-Antwort nach 24 h und nach 48 h

Bei der Untersuchung der Interleukin-6-Gesamtmenge (Abb. 7) in den Zellüberständen der KO-, MC- und MCS-CLPF nach Stimulation mit LPS nach 24 h wurden signifikante IL-6-Antworten im Vergleich zu der unstimulierten Negativkontrolle gefunden. LPS stimuliert bei allen drei CLPF-Gruppen signifikant die IL-6-Sekretion nach 24 h und nach 48 h. Nach 24 h reagieren MC-CLPF mit der stärksten IL-6-Sekretion auf LPS, nach 48 h sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den CLPF-Gruppen mehr nachweisbar.

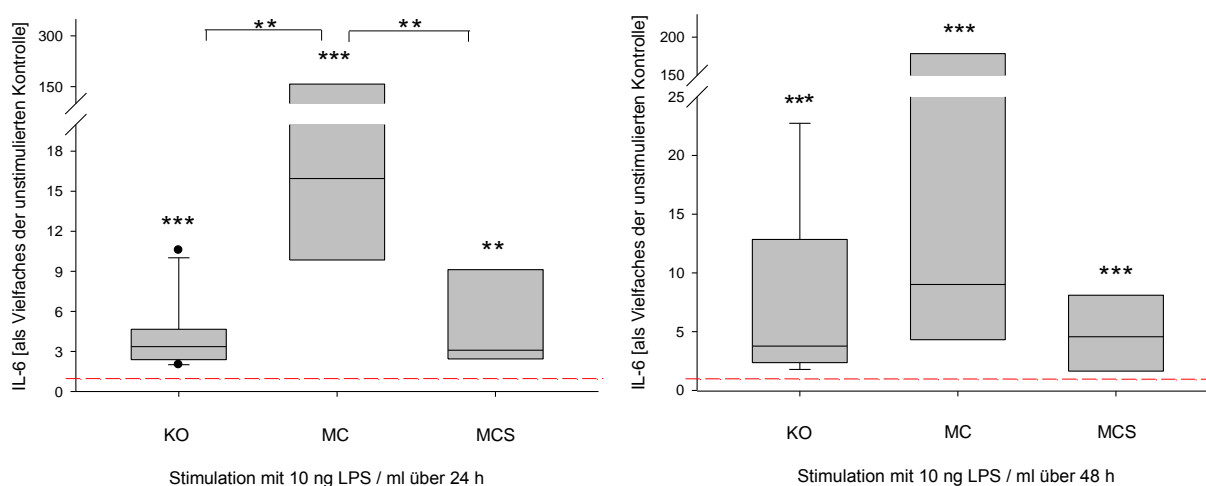


Abbildung 7: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der KO-, MC-, MCS-CLPF mit LPS

KO- (n=10), MC- (n=5), und MCS-CLPF (n=7) wurden mit LPS (10 ng/ml) stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h (linke Abbildung) und nach 48 h (rechte Abbildung) abgenommen und mittels ELISA die IL-6-Konzentration untersucht. Dargestellt ist der Anstieg der Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

## IL-8-Antwort nach 24 h und nach 48 h

Die Interleukin-8-Gesamtkonzentration (Abb. 8) in den Zellüberständen der KO-, MC- und MCS-CLPF nach Stimulation mit LPS wurde nach 24 h und nach 48 h signifikant durch LPS gesteigert. Nach 24 h reagieren MC- und MCS-CLPF mit einer stärkeren IL-8-Sekretion als KO-CLPF. Nach 48 h sind keine Unterschiede mehr in den IL-8-Sekretionen zwischen den CLPF-Gruppen nachweisbar (rechte Abbildung).

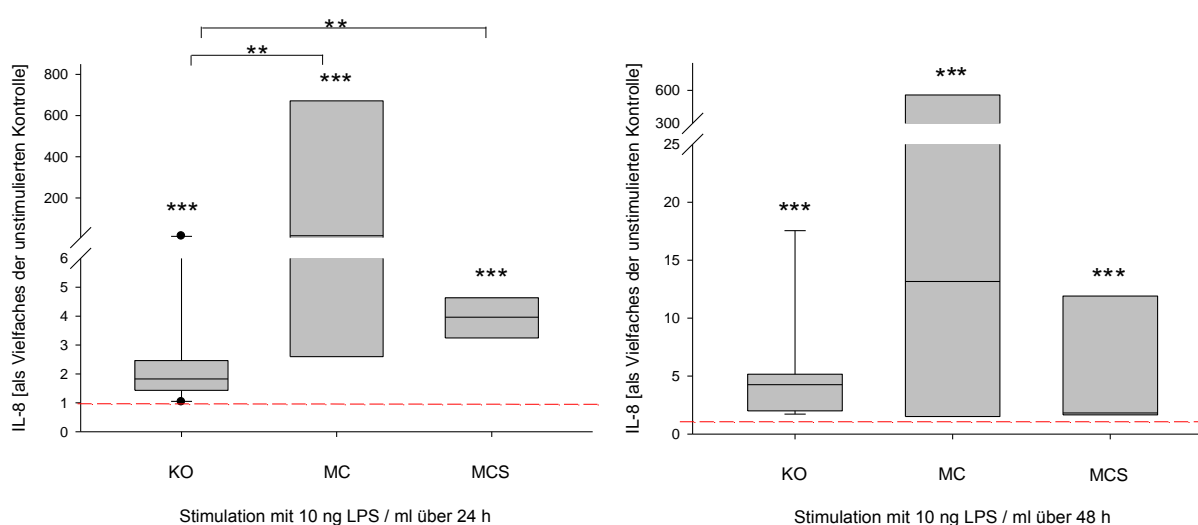


Abbildung 8: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der KO-, MC-, MCS-CLPF mit LPS

KO- (n=10), MC- (n=5) und MCS-CLPF (n=6) wurden mit LPS (10 ng/ml) stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h (linke Abbildung) und nach 48 h (rechte Abbildung) abgenommen und mittels ELISA die IL-8-Konzentration untersucht. Dargestellt ist der Anstieg der Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.



### 4.3.3 Stimulation von KO-, MC- und MCS-CLPF mit CpG-ODN

#### IL-6-Antwort nach 24 h und nach 48 h

KO-, MC- und MCS-CLPF wurden mit CpG-ODN stimuliert. Die Zellüberstände wurden nach 24 h und nach 48 h abgenommen. Bei Betrachtung der IL-6-Konzentrationen wird deutlich, dass CpG-ODN sowohl nach 24 h als auch nach 48 h bei KO-CLPF signifikant die Interleukin-6-Sekretion stimuliert (Abb. 9). Bei MCS-CLPF ist kaum eine Steigerung der IL-6-Sekretion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nachweisbar. MC-CLPF reagieren auf die CpG-ODN-Stimulation nicht, die IL-6-Sekretion ist nahezu unverändert im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Nach 24 h und nach 48 h lassen sich keine Unterschiede in den IL-6-Sekretionen der einzelnen CLPF-Gruppen erkennen.

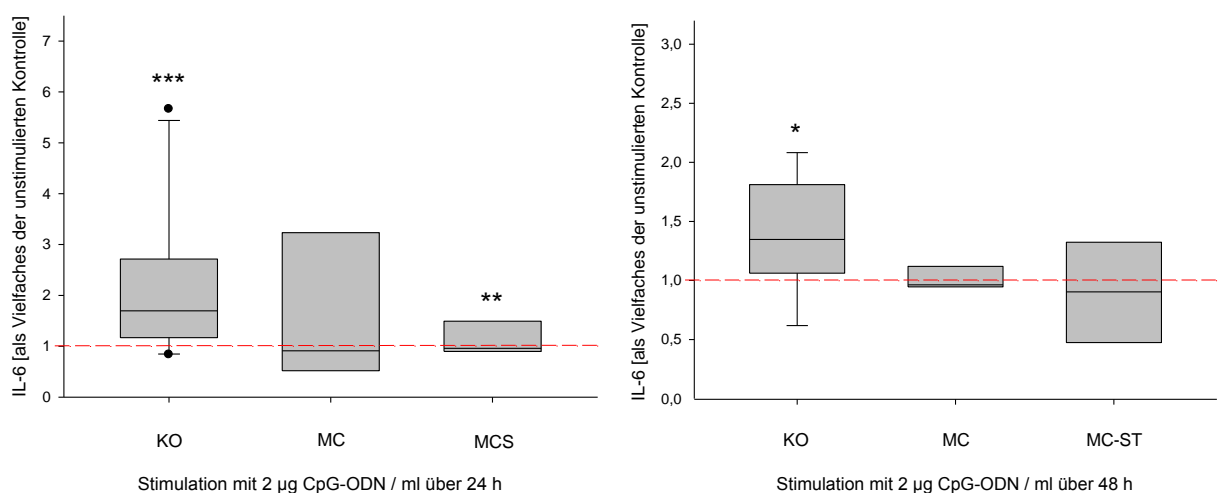


Abbildung 9: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der KO-, MC-, MCS-CLPF mit CpG-ODN

KO- (n=9), MC- (n=6) und MCS-CLPF (n=6) wurden mit CpG-ODN (2 µg/ml) stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h (linke Abbildung) und nach 48 h (rechte Abbildung) abgenommen und mittels ELISA die IL-6-Konzentration untersucht. Dargestellt ist die prozentuale Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

## IL-8-Antwort nach 24 h und nach 48 h

Die IL-8-Antwort von KO-CLPF, MC-CLPF und MCS-CLPF verhält sich nach Stimulation mit CpG-ODN ähnlich wie die IL-6-Antwort. KO-CLPF reagieren nach 24 h mit einer IL-8-Sekretion, die jedoch nicht signifikant ist (Abb. 10). MC- und MCS-CLPF lassen sich nicht stimulieren. Nach 24 h reagieren KO-CLPF mit einer signifikant stärkeren IL-8-Sekretion als MCS-CLPF. Nach 48 h reagiert keine der CLPF-Gruppen auf die CpG-ODN-Stimulation mit einer signifikanten IL-8-Sekretion. Zudem sind keine Unterschiede in den IL-8-Konzentrationen untereinander nachweisbar.

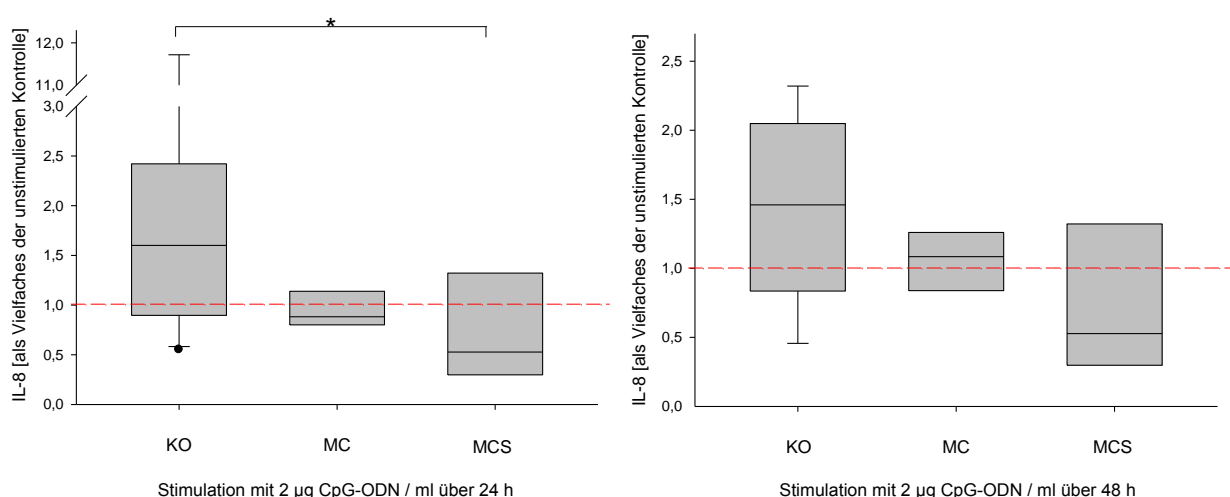


Abbildung 10: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der KO-, MC-, MCS-CLPF mit CpG-ODN

KO- (n=9), MC- (n=6) und MCS-CLPF (n=6) wurden mit CpG-ODN (2 µg/ml) stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h (linke Abbildung) und nach 48 h (rechte Abbildung) abgenommen und mittels ELISA die IL-8-Konzentration untersucht. Dargestellt ist der Anstieg der Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

#### **4.3.4 Zusammenfassung**

TNF und LPS führen in KO-CLPF, MC-CLPF und MCS-CLPF nach 24 h und nach 48 h zu einer signifikanten Steigerung der IL-6- und IL-8-Sekretion. TNF führt zu einer Steigerung der IL-6-Sekretion auf etwa das 150-fache, der IL-8-Sekretion auf etwa das 600-fache. Die IL-8-Konzentrationen nach Stimulation mit TNF sind bei allen drei CLPF-Gruppen (KO, MC, MCS) höher als die IL-6-Konzentrationen nach TNF-Stimulation. LPS führt zu einer Steigerung der IL-6-Sekretion auf etwa das 10-fache, der IL-8-Sekretion auf etwa das 7-fache. CpG-ODN stimuliert in KO-CLPF die IL-6- und IL-8-Sekretion nicht signifikant, in MC-CLPF und MCS-CLPF überhaupt nicht. Zu den Unterschieden zwischen den CLPF-Gruppen lässt sich Folgendes beobachten: Nach Stimulation mit TNF lassen sich keine Unterschiede in den IL-6/IL-8-Konzentrationen der drei CLPF-Gruppen feststellen. Im Stimulationsversuch mit LPS lassen sich MC-CLPF signifikant stärker stimulieren als KO-CLPF und MCS-CLPF und reagieren dementsprechend mit stärkerer IL-6/IL-8-Sekretion. Die Stimulation mit CpG-ODN führt bei KO-CLPF zu einer signifikant höheren IL-6/IL-8-Sekretion als der von MCS-CLPF. Insgesamt bestehen keine größeren Unterschiede zwischen den IL-6-/IL-8 Antworten nach 24 h und nach 48 h.

### **4.4 Interleukin-33**

#### **4.4.1 Nachweis des IL-33-Rezeptors (ST2/IL-1 R<sub>4</sub>)**

Hauptziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob das bisher nur wenig untersuchte Zytokin IL-33 einen Effekt auf die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 von aus dem Darm isolierten CLPF von Patienten, die nicht an einer chronisch entzündliche Darmerkrankung (CED) erkrankt sind bzw. von Patienten mit Morbus Crohn und Patienten mit Morbus Crohn und Stenosen hat. Die Voraussetzung, um einen möglichen Effekt von IL-33 zu untersuchen, ist, dass die isolierten Fibroblasten den IL-33-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. Der Nachweis des IL-33-Rezeptors erfolgte mittels Western Blot. Dazu wurden aus Darmresektaten von KO-Patienten, MC-Patienten und CU-Patienten

Fibroblasten isoliert und diese im Western Blot mit dem IL-33R-AK (namentlich ST2/IL-1 R<sub>4</sub>-AK) beladen. Zudem wurden auch Zellen aus Gesamtbiospien (Biospien, die alle Darmschichten enthalten) auf das Vorhandensein des IL-33-Rezeptors untersucht. Schließlich wurden Lamina propria mononukleäre Zellen (LPMZ) im Western Blot eingesetzt und untersucht, ob diese den IL-33-Rezeptor besitzen. Die zu erwartende Bande des Rezeptors sollte bei 50-63 kDa liegen.

KO-, MC- und CU- Gesamtbiospien exprimieren ST2/IL-1 R<sub>4</sub>

Auf den dargestellten Blots ist jeweils eine Bande bei 50-63 kDa (Abb. 11-12) auf allen Spuren zu sehen. Diese Abbildungen zeigen, dass der IL-33-Rezeptor bei allen drei Patientengruppen (KO, MC, CU) vorhanden ist. Da bei dieser Untersuchung Gesamtbiospien verwendet wurden, ist bei der Auswertung des Ergebnisses jedoch nicht ersichtlich, auf welchen Zelltypen (Epithelzellen, Fibroblasten, Leukozyten) der Gesamtbiospie der Rezeptor exprimiert wird.

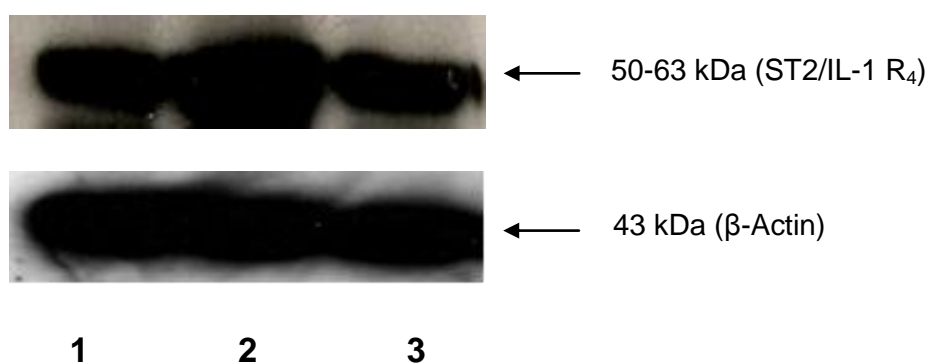


Abbildung 11: Nachweis von ST2/IL-1 R<sub>4</sub> auf Gesamtbiospien von CU-Patienten

Aus unstimulierten Gesamtbiospien von CU-Patienten wurden Gesamtzelllysate gewonnen und auf das Vorhandensein von ST2/IL-1 R<sub>4</sub> untersucht. Pro Spur wurden 50 µg Protein aufgetragen. Alle drei Spuren enthalten eine Bande bei 50-63 kDa. Spalten 1-3: CU.

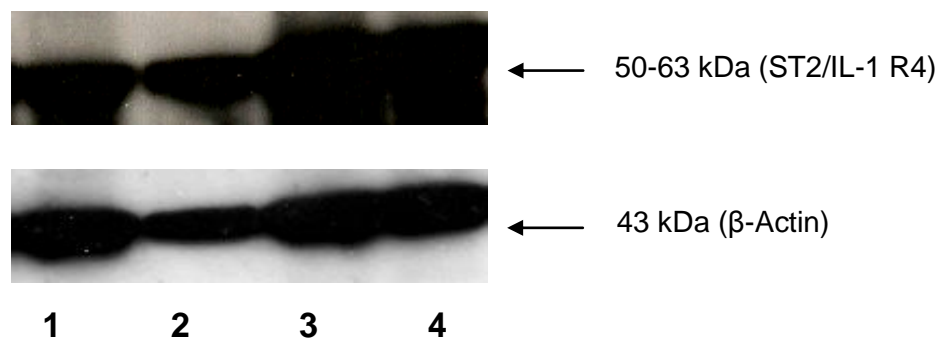


Abbildung 12: Nachweis von ST2/IL-1 R<sub>4</sub> auf Gesamtbiopsien von KO- und MC-Patienten

Aus unstimulierten Gesamtbiopsien von KO- und MC-Patienten wurden Gesamtzelllysate gewonnen und auf das Vorhandensein von ST2/IL-1 R<sub>4</sub> untersucht. Pro Spur wurden 50 µg Protein aufgetragen. Alle vier Spuren enthalten eine Bande bei 50-63 kDa. Spalte 1: MC, Spalte 2-4: KO.

### KO-, MC-, CU- und MC-Fistel-CLPF exprimieren ST2/IL-1 R<sub>4</sub>

Im dargestellten Western Blot (Abb. 13) wurden aus Colon-Resektaten von KO-, MC-, CU- und MC-Fistel (MCF) - Patienten CLPF isoliert. Aus diesen wurden Zelllysate hergestellt und im Western Blot aufgetragen, um das Vorhandensein von ST2/IL-1 R<sub>4</sub> zu untersuchen. Das Ergebnis zeigt auf allen sechs Spuren jeweils eine ausgeprägte Bande bei 50-63 kDa. Im Vergleich untereinander fällt auf, dass die 6. Bande (CU-CLPF) am stärksten ausgeprägt ist.

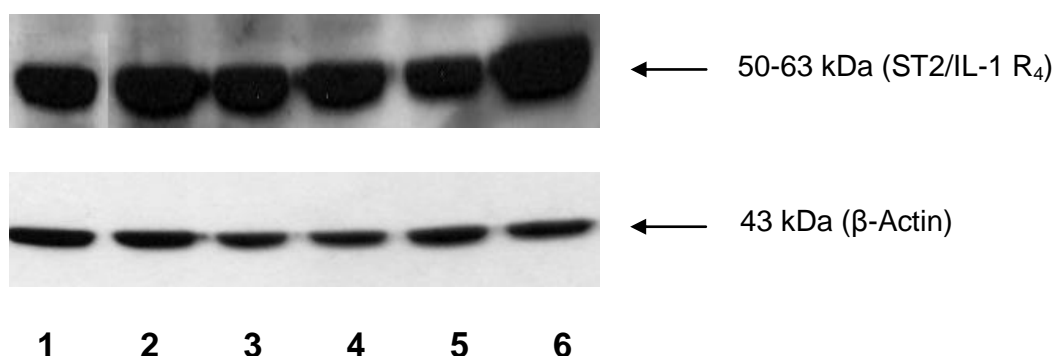


Abbildung 13: Nachweis von ST2/IL-1 R<sub>4</sub> auf unstimulierten KO-, MC-, CU- und MCF-CLPF

Aus unstimulierten CLPF von KO-, MC-, CU- und MCF-Patient-Resektaten wurden Zelllysate gewonnen und auf das Vorhandensein von ST2/IL-1 R<sub>4</sub> untersucht. Pro Spur wurden 50 µg Protein aufgetragen. Auf allen Spuren ist eine Bande bei 50-63 kDa sichtbar. Spalte 1: KO, Spalte 2: MC, Spalte 3: Fistel, Spalte 4: Fistel, Spalte 5: Fistel, Spalte 6: CU.

## KO-, MC- und CU- LPMZ exprimieren ST2/IL-1 R<sub>4</sub>

In dem dargestellten Western Blot (Abb. 14) wurden LPMZ aus Colon-Resektaten von KO-, MC- sowie CU-Patienten extrahiert und Zelllysate daraus gewonnen. 50 µg des jeweiligen Lysats wurde im Agarosegel pro Spur aufgetragen. Nach der erfolgten Proteintrennung erfolgte der Immunoblot mit Anti-human ST2/IL-1 R<sub>4</sub> zum Nachweis von ST2/IL-1 R<sub>4</sub>. Auf allen neun Spuren ist eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Bande bei 50-63 kDa zu sehen. Besonders imponieren die sehr starken Banden der MC-LPMZ (Spur 4-6). im Vergleich zu KO- (Spur 7-9) und CU- (Spur 1-3) LPMZ.

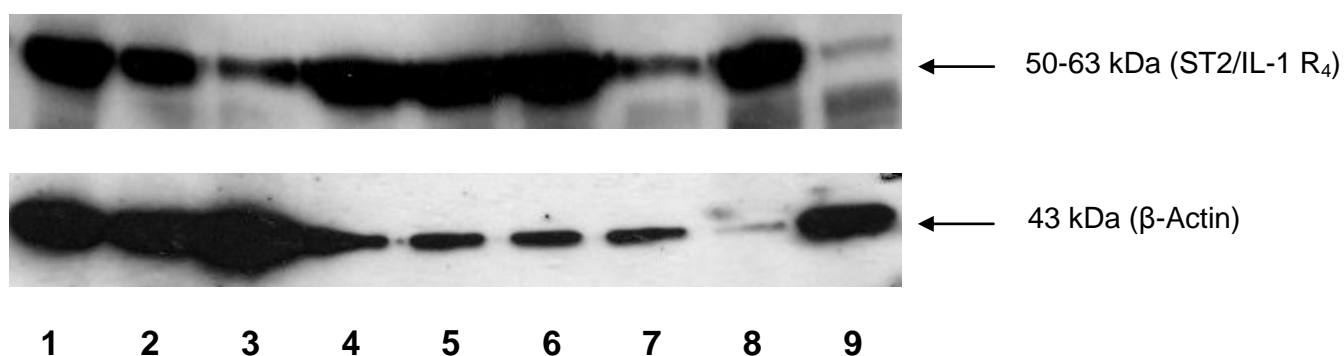


Abbildung 14: Nachweis von ST2/IL-1 R<sub>4</sub> auf unstimulierten KO-, MC- und CU-LPMZ

Aus unstimulierten LPMZ von KO-, MC- und CU-Patient-Resektaten wurden Zelllysate gewonnen und auf das Vorhandensein von ST2/IL-1 R<sub>4</sub> untersucht. Pro Spur wurden 50 µg Protein aufgetragen. Auf allen Spuren ist eine Bande bei 50-63 kDa sichtbar. Spalte 1: CU-1 (entzündet), Spalte 2: CU-2 (nicht entzündet), Spalte 3: CU-3, Spalte 4: MC-1, Spalte 5: MC-2, Spalte 6: MC-3, Spalte 7: KO-1, Spalte 8: KO-2, Spalte 9: KO-3.

#### 4.4.2 Stimulation von CLPF mit IL-33, Dosis-/Zeitabhängigkeit

##### IL-6-Antwort bei KO-CLPF nach 24 h und nach 48 h

Bei der Untersuchung der Interleukin-6-Konzentration (Abb. 15) der KO-CLPF nach Stimulation mit steigenden Konzentrationen von IL-33 zeigt sich eine Dosisabhängigkeit: Nach 24 h bewirken niedrige Konzentrationen von IL-33 keine signifikant gesteigerte IL-6/IL-8-Sekretion; ab einer Konzentration von 10 ng/ml wirkt IL-33 stimulierend. Ab dieser Konzentration ist eine signifikant gesteigerte IL-6-Sekretion nachweisbar. Die Ergebnisse nach 48 h zeigen, dass nach einer längeren Wirkzeit auch die niedrigen IL-33-Konzentrationen auf die IL-6-Sekretion signifikant stimulierend wirken. Die IL-6-Sekretion steigt nicht direkt proportional zu der IL-33-Konzentration.

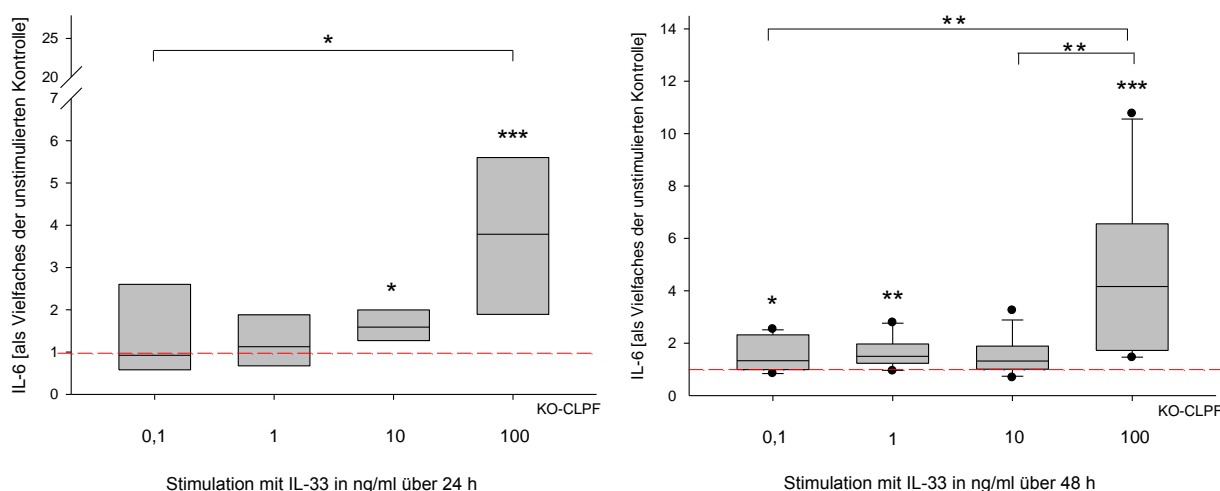


Abbildung 15: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF mit steigenden Dosen von IL-33

KO-CLPF wurden mit steigenden Konzentrationen von IL-33 [0,1 ng/ml (n=6), 1 ng/ml (n=7), 10 ng/ml (n=8), 100 ng/ml (n=7)] stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h (linke Abbildung) und nach 48 h (rechte Abbildung) abgenommen und mittels ELISA die IL-6-Konzentration untersucht. Dargestellt ist die prozentuale Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.





## IL-6-Antwort bei MC-CLPF nach 24 h und nach 48 h

Bei der Untersuchung der Interleukin-6-Gesamtkonzentration (Abb. 17) in den Zellüberständen der MC-CLPF nach Stimulation mit steigenden Dosen von IL-33 zeigt sich eine zum Teil signifikante Steigerung der IL-6-Sekretion. Eine Dosisabhängigkeit besteht nicht, die IL-6-Sekretion nach 24 h entspricht einer Glockenkurve mit einem maximalen Effekt bei 10 ng/ml IL-33. Die IL-6-Sekretion nach 48 h zeigt ebenfalls eine deutliche Steigerung der IL-6-Produktion durch IL-33, allerdings ist auch hier kein klarer Dosis-Wirkungseffekt erkennbar.

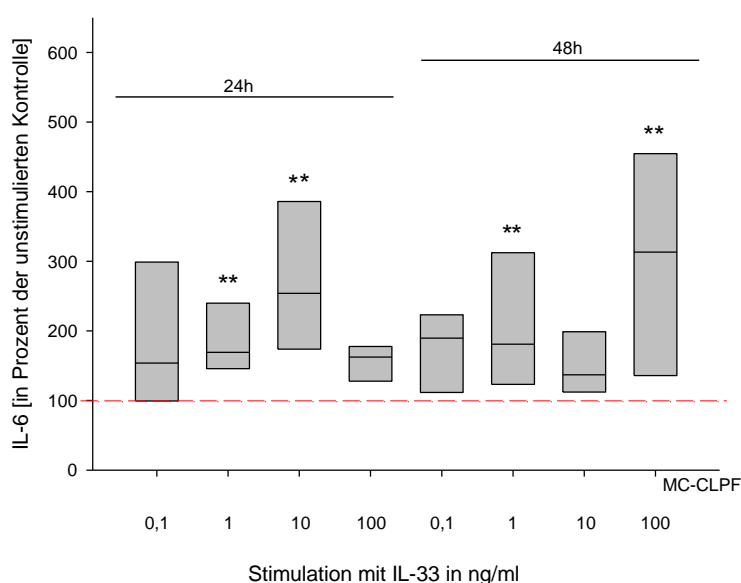


Abbildung 17: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der MC-CLPF mit steigenden Dosen von IL-33

MC-CLPF wurden mit steigenden Konzentrationen von IL-33, n=6 (0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h und nach 48 h abgenommen und mittels ELISA die IL-6-Konzentration untersucht. Dargestellt ist die prozentuale Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 100 %. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

## IL-8-Antwort bei MC-CLPF nach 24 h und nach 48 h

Durch steigende Konzentrationen von IL-33 lassen sich MC-CLPF stimulieren und antworten mit einer zum Teil signifikant gesteigerten IL-8-Sekretion (Abb. 18). Wie bei der IL-6-Antwort bereits beschrieben, besteht auch bei der IL-8-Sekretion kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung mit einem maximalen Effekt nach 24 Stunden mit 10 ng/ml und nach 48 h mit 100 ng/ml IL-33.

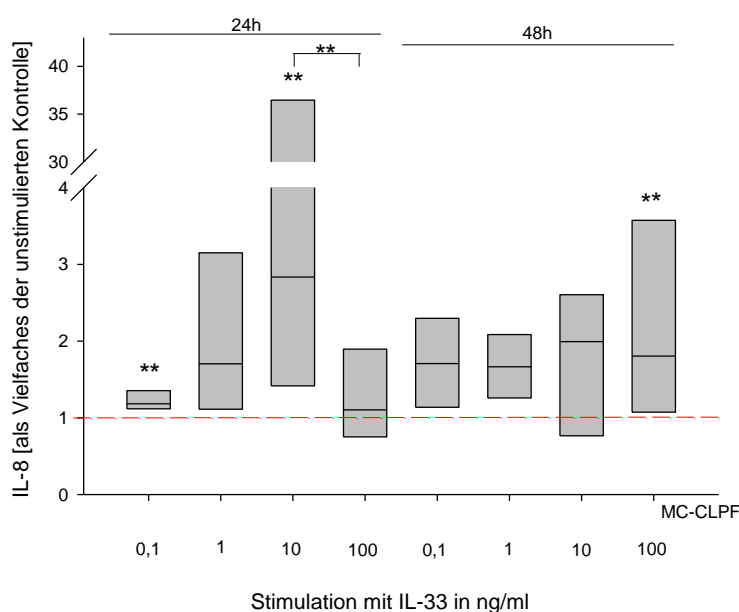


Abbildung 18: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der MC-CLPF mit steigenden Dosen von IL-33

MC-CLPF wurden mit steigenden Konzentrationen von IL-33, n=6 (0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h und nach 48 h abgenommen und mittels ELISA die IL-8-Konzentration untersucht. Dargestellt ist der Anstieg der Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

## IL-6-Antwort bei MCS-CLPF nach 24 h und nach 48 h

Betrachtet man die Interleukin-6-Konzentrationen (Abb. 19) in den Zellüberständen der MCS-CLPF nach Stimulation mit steigenden Konzentrationen von IL-33, zeigt sich eine zum Teil signifikante (Stimulation mit 0,1 ng und 10 ng IL-33) etwa 2,5-fache Steigerung der IL-6 Sekretion. Die Höhe der IL-6-Konzentrationen zeigt jedoch keine Abhängigkeit von der IL-33-Dosis. Nach 48 h Inkubationszeit lässt sich die signifikant gesteigerte IL-6-Sekretion nicht mehr nachweisen.

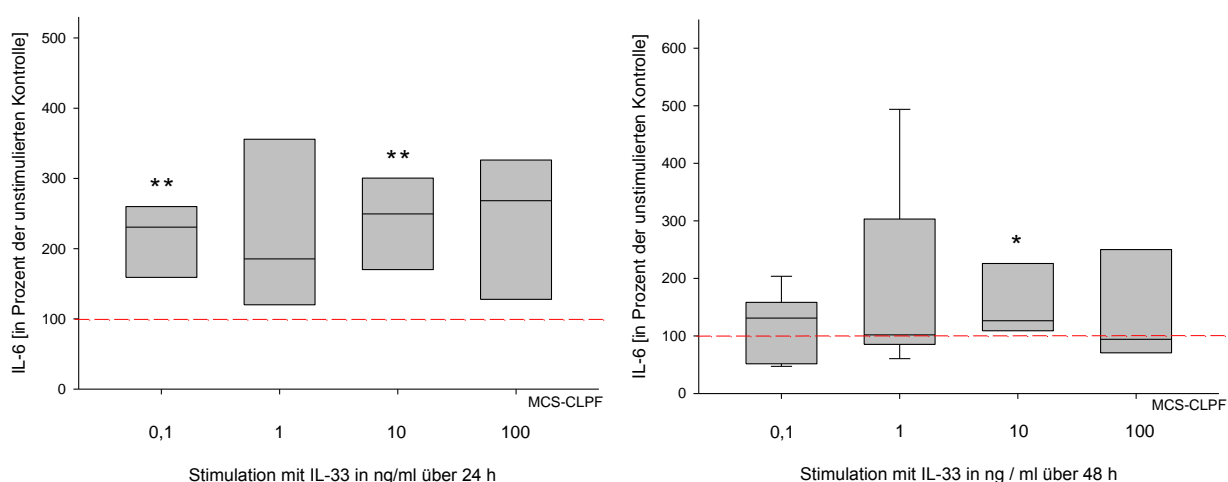


Abbildung 19: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der MCS-CLPF mit steigenden Dosen von IL 33

MCS-CLPF wurden mit steigenden Konzentrationen von IL-33, n=6 (0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h (linke Abbildung) und nach 48 h (rechte Abbildung) abgenommen und mittels ELISA die IL-6-Konzentration untersucht. Dargestellt ist die prozentuale Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 100 %. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

## IL-8-Antwort bei MCS-CLPF nach 24 h und nach 48 h

Bei Betrachtung der IL-8-Antwort (Abb. 20) der MCS-CLPF nach Stimulation mit steigenden Konzentrationen von IL-33 zeigt sich nach 24 h eine signifikante Steigerung der IL-8-Sekretion. Es lässt sich jedoch kein Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung erkennen. Insgesamt ist das IL-8-Verhalten ähnlich dem IL-6-Verhalten. Nach 48 h fällt die IL-33 abhängige IL-8-Sekretion niedriger aus und zeigt nur noch bei 0,1 ng/ml IL-33 einen signifikanten Effekt.

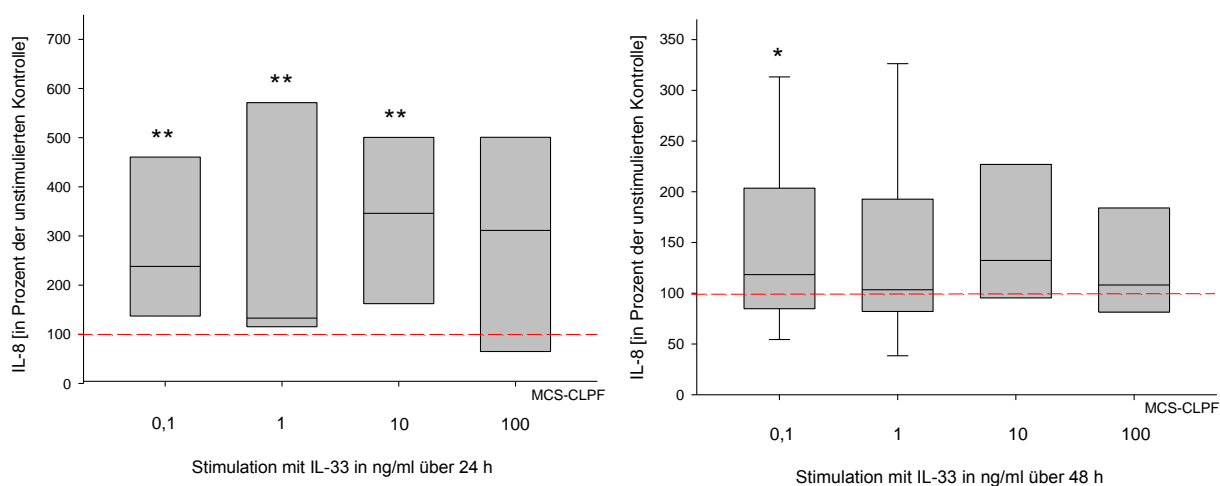


Abbildung 20: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der MCS-CLPF mit steigenden Dosen von IL-33

MCS-CLPF wurden mit steigenden Konzentrationen von IL-33 [0,1 ng/ml (n=6), 1 ng/ml (n=5), 10 ng/ml (n=6), 100 ng/ml (n=6)] stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h (linke Abbildung) und nach 48 h (rechte Abbildung) abgenommen und mittels ELISA die IL-8-Konzentration untersucht. Dargestellt ist die prozentuale Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 100 %. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

## Übersicht der IL-6-Antwort bei KO-, MC- und MCS-CLPF nach 24 h

In Abbildung 21 wurden zusammenfassend die IL-6-Konzentrationen von KO-, MC- und MCS-CLPF nach Stimulation mit IL-33 nach 24 h dargestellt. Das Diagramm zeigt, dass alle drei CLPF-Gruppen mit einer gesteigerten IL-6-Konzentration auf die Stimulation antworten. MC- und MCS-CLPF scheinen mit einer nicht signifikant stärkeren IL-6-Antwort auf alle IL-33-Konzentrationen als KO-CLPF zu reagieren, während KO-CLPF erst ab einer Konzentration von 10 ng/ml mit einer eindeutig gesteigerten IL-6-Konzentration antworten. In niedrigen Konzentrationen (0,1 ng/ml) ist die Reaktion der KO- und MC-CLPF nicht signifikant. Bei KO-CLPF lässt sich eine Dosisabhängigkeit erkennen, bei MC- und MCS-CLPF nicht.

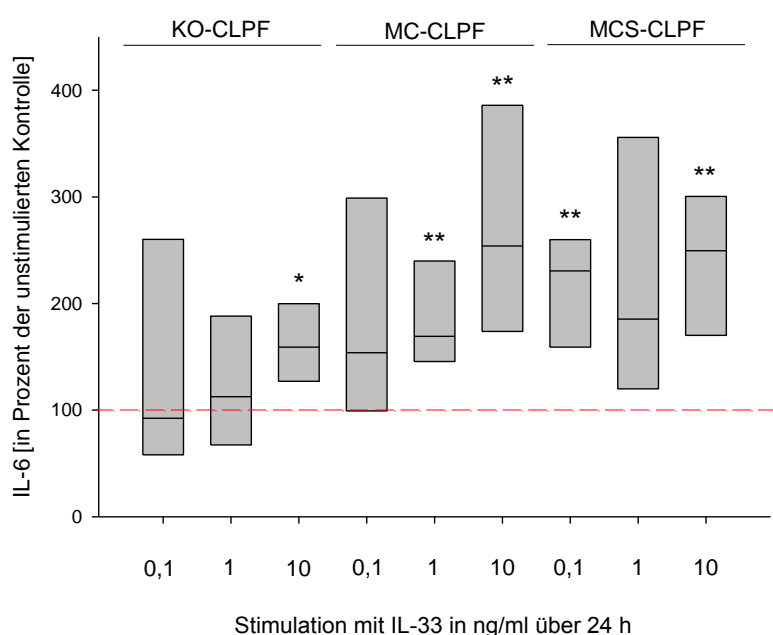


Abbildung 21: Zusammenfassung der Interleukin-6-Antwort bei Stimulation von KO-, MC- und MCS-CLPF mit steigenden Dosen von IL-33

KO-, MC- und MCS-CLPF wurden mit steigenden Konzentrationen von IL-33 [0,1 ng/ml (n=6), 1 ng/ml (n=7), 10 ng/ml (n=6)] stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h abgenommen und mittels ELISA die IL-6-Konzentration untersucht. Dargestellt ist die prozentuale Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 100 %. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

## Übersicht der IL-8-Antwort bei KO-, MC- und MCS-CLPF nach 24 h

Abbildung 22 zeigt die Zusammenfassung der IL-8-Sekretionen nach IL-33-Stimulation bei KO-, MC- und MCS-CLPF nach 24 h. Ähnlich wie bei der IL-6-Antwort zeigt sich eine Steigerung der IL-8-Sekretion. Anders als bei der IL-6-Ausbeute zeigen sich hier keine großen quantitativen Unterschiede untereinander; auffällig ist lediglich, dass die IL-8-Antwort bei MC- und MCS-CLPF auch auf die niedrigen IL-33-Konzentrationen signifikant ist, nicht jedoch bei KO-CLPF. Ferner lässt sich keine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit erkennen.

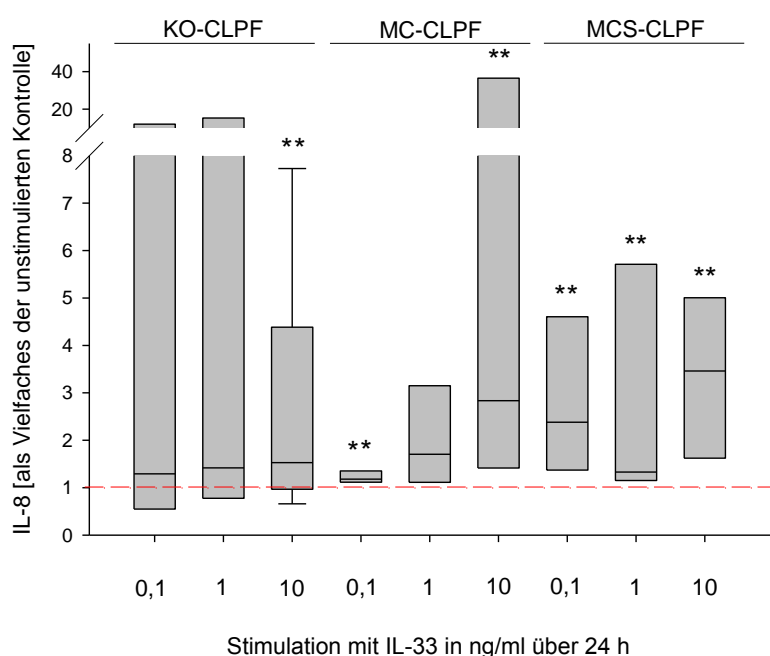


Abbildung 22: Zusammenfassung der Interleukin-8-Antwort bei Stimulation von KO-, MC- und MCS-CLPF mit steigenden Dosen von IL-33

KO-, MC- und MCS-CLPF wurden mit steigenden Konzentrationen von IL-33 [0,1 ng/ml (n=6), 1 ng/ml (n=6), 10 ng/ml (n=7)] stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h abgenommen und mittels ELISA die IL-8-Konzentration untersucht. Dargestellt ist der Anstieg der Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

#### 4.4.3 Zusammenfassung

IL-33 stimuliert in KO-CLPF, MC-CLPF und MCS-CLPF teilweise signifikant die IL-6- und die IL-8-Sekretion. Sowohl MC-CLPF als auch MCS-CLPF reagieren tendenziell, jedoch nicht signifikant mit einer stärkeren IL-6- und IL-8-Sekretion als KO-CLPF. Bereits bei den niedrigen IL-33-Konzentrationen (0,1 ng/ml und 1 ng/ml) lässt sich bei MC- und MCS-CLPF eine ca. 2-fache Steigerung der IL-6- und IL-8-Sekretion beobachten, während KO-CLPF lediglich mit einer ca. 1,3-fachen Steigerung reagieren. Die Stimulationsversuche ergeben keine eindeutige Dosisabhängigkeit der IL-6/IL-8-Sekretion von IL-33. KO-CLPF reagieren auf steigende IL-33-Konzentrationen mit erhöhter IL-6/IL-8-Sekretion, jedoch nicht direkt proportional. Bei MC- und MCS-CLPF ist kein Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung erkennbar. Die IL-6/IL-8-Antwort verhält sich nach 24 h ähnlich wie nach 48 h.

#### 4.4.4 Einfluss der Stimulationen auf die Signaltransduktion von IL-33

Im Rahmen der Stimulation mit IL-33 sollte unter anderem untersucht werden, ob die intrazellulären Signalwege durch verschiedene Stimulanzen „hoch-“ oder „herrunterreguliert“ werden und ob es hierbei Unterschiede zwischen KO-CLPF und MCS-CLPF im Signaltransduktionsweg gibt. Wie in Kapitel 1.3.3 vorbeschrieben, erfolgt nach Bindung von IL-33 an seinen Rezeptor die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalfade. Um zu klären, welche Signalwege bei den verwendeten CLPF in welchem Maße aktiviert werden, wurde die Aktivierung von p-ERK 42/44 und *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B p65) untersucht. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Stimulationsversuchen mit IL-33 fällt auf, dass CLPF von Patienten mit Morbus Crohn, bzw. Stenosen bei bekanntem Morbus Crohn mit einer quantitativ höheren Zytokin-sekretion reagieren als die Kontrolle. Daher macht es Sinn, sich mit der Frage zu befassen, ob MC- und MCS-CLPF vielleicht eine erhöhte Aktivierung von ERK1/2 aufweisen und sich dadurch das IL-6-/IL-8-Verhalten von MCS-CLPF im Vergleich zu KO-CLPF erklären lässt. Dazu wurden jeweils KO-CLPF und MCS-CLPF mit LPS, TNF, CpG-ODN, IL-33 sowie LPS+IL-33, TNF+IL-33 und

CpG-ODN+IL-33 über 24 h und 48 h stimuliert. Die Proteine p-ERK 42/44 und NF- $\kappa$ B p65 wurden mittels Western Blot aus Gesamtzelllysaten (für p-ERK 42/44) (für NF- $\kappa$ B p65) detektiert.



## TNF, LPS, CpG-ODN und IL-33 haben bei KO-CLPF nach 48 h keinen Einfluss auf die p-ERK-Aktivierung

Im Stimulationsversuch mit KO-CLPF wurden diese mit TNF, LPS, CpG-ODN, IL-33 sowie mit TNF+IL-33, LPS+IL-33 und CpG-ODN+IL-33 stimuliert. Nach der Zellüberstandabnahme nach 48 h Inkubation wurden die Fibroblasten in der Mehrlochplatte lysiert, um Proteinlysate aus ihnen zu gewinnen. Die gewonnenen Proteinlysate aus den stimulierten Fibroblasten wurden im Western Blot aufgetragen und anschließend im Immunoblot mit einem AK gegen p-ERK versetzt. Bei Betrachtung des Ergebnisses zeigen sich (Abb. 23) auf allen acht Spuren jeweils zwei gleich dicke Banden. Die zwei Banden auf Spur 8 sind im Vergleich zu den restlichen auf den anderen Spuren etwas schwächer. Zu einer weiteren Interpretation muss die  $\beta$ -Actin-Ladungskontrolle herangezogen werden. Auf Spur 1 waren die unstimulierten Fibroblastenlysate aufgetragen. Die Banden auf Spur 1 unterscheiden sich nicht von den Banden auf den anderen Spuren. Infolgedessen zeigen die einzelnen Stimulanzien insgesamt keinen Effekt nach 48 h auf die p-ERK-Aktivierung in KO-CLPF.

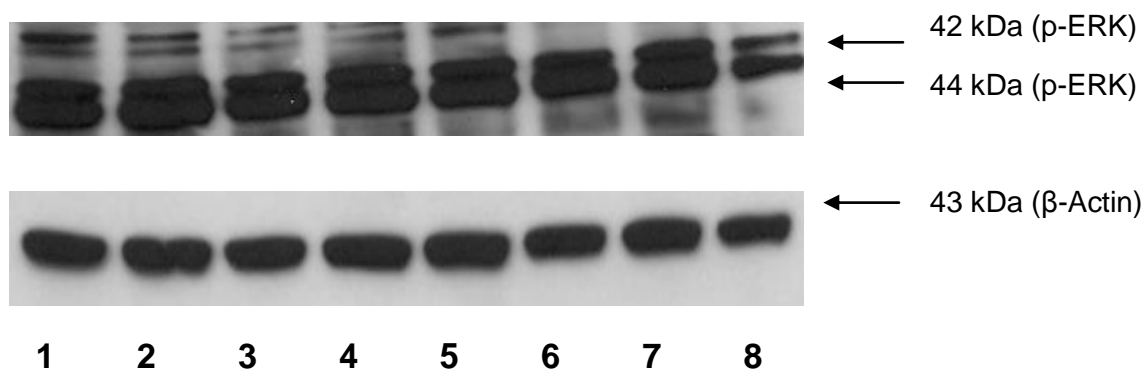


Abbildung 23: Einfluss von LPS, TNF, CpG-ODN und IL-33 auf die Aktivierung und Phosphorylierung von p-ERK 42/44 bei KO-CLPF nach 48 h

KO-CLPF wurden über 48 h mit LPS, TNF, CpG-ODN und IL-33 inkubiert. Nach erfolgter Überstandabnahme nach 48 h wurden aus den CLPF Proteinlysate gewonnen. Diese wurden mittels Western Blot auf die Aktivierung von p-ERK 42/44 untersucht. Folgende Konzentrationen wurden eingesetzt: LPS 10 ng/ml, TNF 1 ng/ml, CpG-ODN 2  $\mu$ g/ml und IL-33 10 ng/ml. Spalte 1: unstimuliert, Spalte 2: LPS, Spalte 3: TNF, Spalte 4: CpG-ODN, Spalte 5: IL-33, Spalte 6: LPS+IL-33, Spalte 7: TNF+IL-33 und Spalte 8: CpG-ODN+IL-33.

## TNF, LPS, CpG-ODN und IL-33 haben bei KO-CLPF nach 48 h keinen Einfluss auf die NF- $\kappa$ B p65-Aktivierung

Nach 48-stündiger Inkubation von KO-CLPF mit TNF, LPS, CpG-ODN, IL-33 sowie TNF+IL-33, LPS+IL-33 und CpG-ODN+IL-33 wurden die CLPF zu Proteinlysaten verarbeitet und im Western Blot auf NF $\kappa$ -B p65-Aktivierung untersucht. Als Ergebnis zeigen sich acht Spuren mit jeweils einer Bande bei 65 kDa. Vergleicht man die Banden untereinander, insbesondere mit Spur 1 (unstimulierte Fibroblasten), so ist kein Unterschied festzustellen. NF- $\kappa$ B p65 ist auf allen Spuren nachweisbar, jedoch lässt sich keine Regulierung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B p65 durch die einzelnen Stimulanzen nach 48 h nachweisen (Abb. 24). Es lässt sich weder ein Einfluss durch die Stimulation mit IL-33 noch durch die Kostimulationen mit TNF, LPS und CpG-ODN auf die NF- $\kappa$ B p65-Aktivierung von KO-CLPF nach 48 h erkennen.

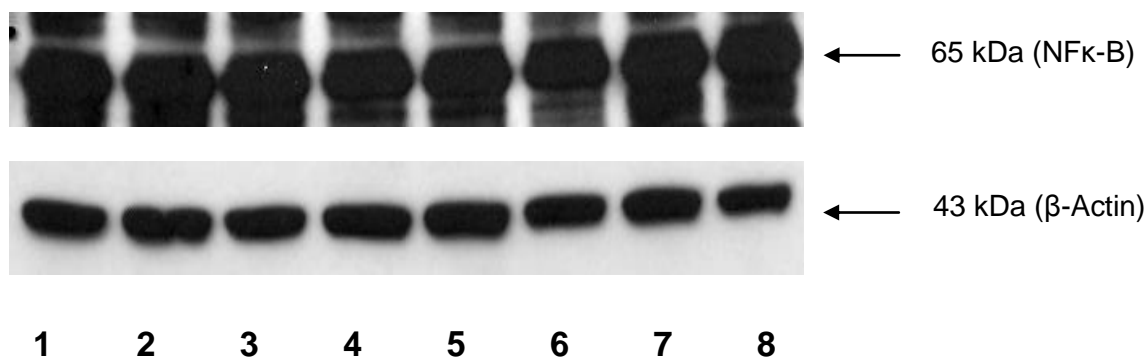


Abbildung 24: Einfluss von LPS, TNF, CpG-ODN und IL-33 auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B p65 bei KO-CLPF nach 48 h

KO-CLPF wurden über 48 h mit LPS, TNF, CpG-ODN und IL-33 inkubiert. Nach erfolgter Überstandabnahme nach 48 h wurden aus den CLPF Proteinlysate gewonnen. Diese wurden mittels Western Blot auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B p65 untersucht. Folgende Konzentrationen wurden eingesetzt: LPS 10 ng/ml, TNF 1 ng/ml, CpG-ODN 2  $\mu$ g/ml und IL-33 10 ng/ml. Spalte 1: unstimuliert, Spalte 2: LPS, Spalte 3: TNF, Spalte 4: CpG-ODN, Spalte 5: IL-33, Spalte 6: LPS+IL-33, Spalte 7: TNF+IL-33 und Spalte 8: CpG-ODN+IL-33.

## TNF+IL-33 und CpG-ODN+IL-33 aktivieren bei MCS-CLPF nach 48 h p-ERK

MCS-CLPF wurden mit TNF, LPS, CpG-ODN, IL-33 sowie TNF+IL-33, LPS+IL-33 und CpG-ODN+IL-33 inkubiert. Nach 48 h wurden die Zellüberstände abgenommen und mittels ELISA untersucht. Die verbliebenen MCS-CLPF wurden zu Zelllysaten verarbeitet und im Western Blot auf Aktivierung von p-ERK untersucht. Auf allen acht Spuren (Abb. 25) sind jeweils zwei Banden, eine bei 42 kDa und eine bei 44 kDa zu sehen. Im Vergleich fällt auf, dass die Doppelbanden auf Spur 7 und Spur 8 stärker sind als die restlichen Banden auf den anderen Spuren. Auf Spur 1 sind unstimulierte MCS-Zelllysate aufgetragen. In Folge dessen wird deutlich, dass TNF+IL-33 und CpG-ODN+IL-33 p-ERK aktivieren. Die Untersuchung der p-ERK-Aktivierung in MCS-CLPF zeigt nach Stimulation mit TNF, LPS, CpG-ODN und IL-33 keinen Effekt im Vergleich zu „unstimuliert“ (Spur 1), während die Kostimulationen mit TNF+IL-33 und CpG-ODN+IL-33 den Signaltransduktionsweg über p-ERK 42/44 aktivieren.

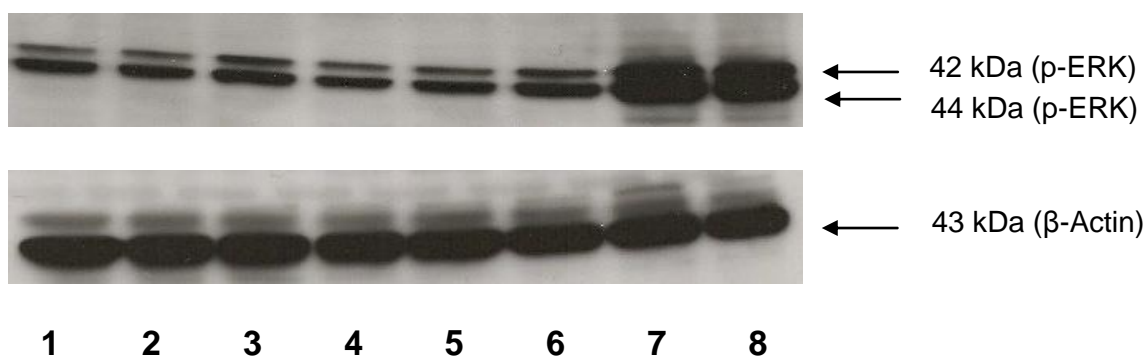


Abbildung 25: Einfluss von LPS, TNF, CpG-ODN und IL-33 auf die Expression und Phosphorylierung von p-ERK 42/44 bei MCS-CLPF nach 48 h

MCS-CLPF wurden über 48 h mit LPS (10 ng/ml), TNF (1 ng/ml), CpG-ODN (2 µg/ml) und IL-33 (10 ng/ml) inkubiert. Nach erfolgter Überstandabnahme nach 48 h wurden aus den CLPF Proteinlysate gewonnen. Diese wurden mittels Western Blot auf die Aktivierung von p-ERK 42/44 untersucht. Spalte 1: unstimuliert, Spalte 2: LPS, Spalte 3: TNF, Spalte 4: CpG-ODN, Spalte 5: IL-33, Spalte 6: LPS+IL-33, Spalte 7: TNF+IL-33 und Spalte 8: CpG-ODN+IL-33.

## TNF, LPS, CpG-ODN und IL-33 haben bei MCS-CLPF nach 48 h keinen Einfluss auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung

MCS-CLPF wurden über 48 h mit TNF, LPS, CpG-ODN, IL-33, TNF+IL-33, LPS+IL-33 und CpG-ODN+IL-33 stimuliert. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt und diese im Western Blot auf NF- $\kappa$ B p65-Aktivierung untersucht. Bei Betrachtung des Ergebnisses (Abb. 26) zeigen sich acht Spuren. Jede Spur beinhaltet eine Bande bei 65 kDa. Vergleicht man die Banden untereinander, ist kein Unterschied zu sehen. Die einzelnen Stimulanzen üben nach 48 h Inkubation keinen Einfluss auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B p65 in MCS-CLPF aus.

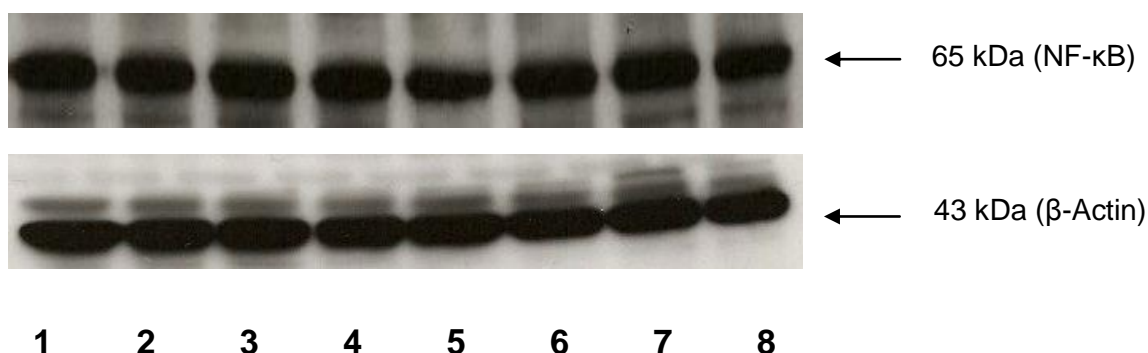


Abbildung 26: Einfluss von LPS, TNF, CpG-ODN und IL-33 auf die Aktivierung und Phosphorylierung von NF- $\kappa$ B p65 bei MCS-CLPF nach 48 h

MCS-CLPF wurden über 48 h mit LPS (10 ng/ml), TNF (1 ng/ml), CpG-ODN (2  $\mu$ g/ml) und IL-33 (10 ng/ml) inkubiert. Nach erfolgter Überstandabnahme nach 48 h wurden aus den CLPF Proteinlysate gewonnen. Diese wurden mittels Western Blot auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B p65 untersucht. Spalte 1: unstimuliert, Spalte 2: LPS, Spalte 3: TNF, Spalte 4: CpG-ODN, Spalte 5: IL-33, Spalte 6: LPS+IL-33, Spalte 7: TNF+IL-33 und Spalte 8: CpG-ODN+IL-33.

#### **4.4.5 Zusammenfassung**

Wenn man die Signaltransduktion in stimulierten KO-CLPF und MCS-CLPF nach 48 h untersucht, sind bezüglich der NF- $\kappa$ B p65-Aktivierung keine Unterschiede zwischen KO-CLPF und MCS-CLPF festzustellen. In beiden CLPF-Gruppen bewirken die verschiedenen Stimulationen zu diesem Zeitpunkt keine nachweisbare NF- $\kappa$ B p65-Aktivierung.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Untersuchung auf p-ERK 42/44-Aktivierung ist ein Unterschied zwischen KO- und MCS-CLPF festzustellen. Während KO-CLPF auf die verschiedenen Stimulanzen mit keiner p-ERK-42/44-Aktivierung reagieren, führen TNF+IL-33 sowie CpG-ODN+IL-33 bei MCS-CLPF zu einer deutlichen p-ERK-42/44-Aktivierung nach 48 h. Interessant ist, dass IL-33 allein zu keiner p-ERK-42/44-Aktivierung führt.

## 4.5 Kostimulationsexperimente

### 4.5.1 Stimulation von KO-, MC- und MCS-CLPF mit TNF und TNF+IL-33

#### IL-6-Antwort nach 48 h

In dem unten stehenden Diagramm (Abb. 27) sind die IL-6-Sekretionen von drei CLPF-Typen (KO, MC, MCS) aufgetragen. Alle drei CLPF-Typen wurden jeweils mit TNF oder TNF+IL-33 stimuliert. Bei Betrachtung der IL-6-Antworten in den Zellüberständen aller drei Versuchsgruppen lassen sich kaum Unterschiede feststellen. Nach 48 h lassen sich keine Unterschiede im Reaktionsverhalten der CLPF-Gruppen untereinander feststellen. KO-, MC- und MCS-CLPF lassen sich sowohl durch TNF als auch durch TNF und IL-33 signifikant stimulieren. Bei allen CLPF-Gruppen wirkt sich die zusätzliche IL-33-Stimulation nicht additiv auf die IL-6-Sekretion aus. Die IL-6-Antwort nach 24 h verhält sich qualitativ wie nach 48 h, daher wird auf ihre Darstellung verzichtet.

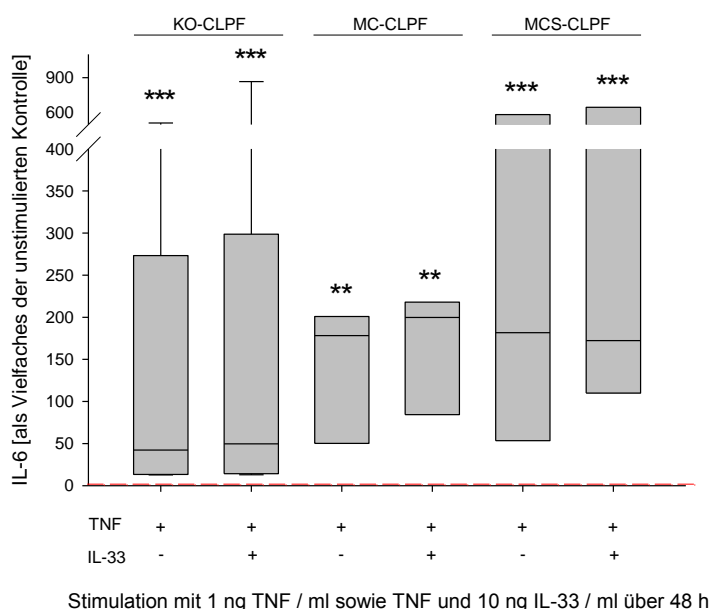


Abbildung 27: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF mit TNF, TNF+IL-33

KO- (n=10), MC- (n=6), und MCS-CLPF (n=7) wurden mit TNF (1 ng/ml) oder TNF und IL-33 (10 ng/ml) stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 48 h abgenommen und mittels ELISA die IL-6-Konzentration untersucht. KO steht für Kontrolle, MC steht für Morbus Crohn und MCS steht für MCS. Dargestellt ist der Anstieg der Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

## IL-8-Antwort nach 24 h

Die IL-8-Antwort in den Zellüberständen aller drei Versuchsgruppen (KO, MC, MCS) verhält sich ähnlich wie die IL-6-Antwort (Abb. 28). Alle drei CLPF-Gruppen reagieren mit einer signifikanten IL-8-Sekretion auf die Stimulationen. Wie bei der IL-6-Antwort, sind auch hier keine Unterschiede bei der IL-8-Sekretion der einzelnen CLPF-Gruppen untereinander vorhanden; alle CLPF-Gruppen reagieren mit einer ähnlich starken IL-8-Sekretion auf die TNF oder TNF+IL-33-Stimulation. Die Kostimulation mit IL-33 bringt keinen additiven Effekt. Es bestehen keine Unterschiede zwischen 24 h und 48 h, daher ist nur das Ergebnis nach 24 h dargestellt.

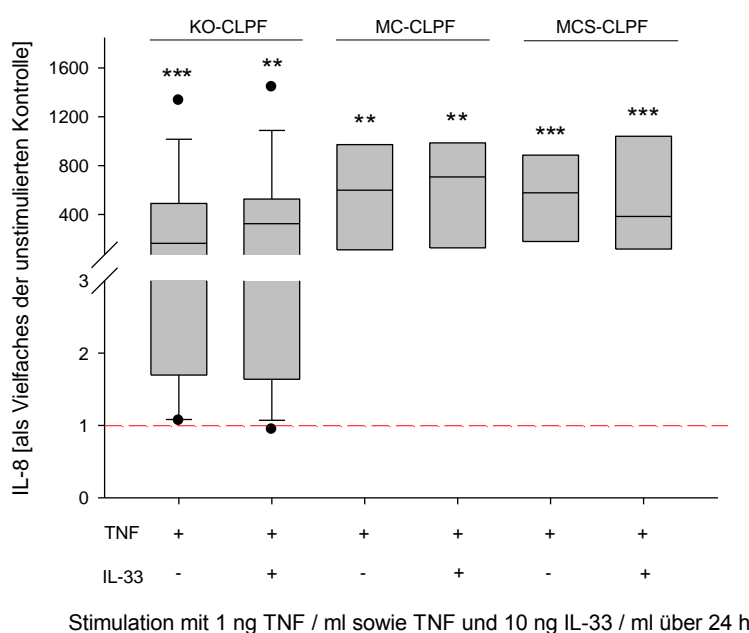


Abbildung 28: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF mit TNF, TNF+IL-33

KO- (n=14), MC- (n=6) und MCS-CLPF (n=7) wurden mit TNF (1 ng/ml) oder TNF und IL-33 (10 ng/ml) stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h abgenommen und mittels ELISA die IL-8-Konzentration untersucht. KO steht für Kontrolle, MC steht für Morbus Crohn und MCS steht für Morbus Crohn Stenose. Dargestellt ist die prozentuale Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 100 %. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

## 4.5.2 Stimulation von KO-, MC- und MCS-CLPF mit LPS und LPS+IL-33

### IL-6-Antwort nach 24 h und nach 48 h

Die Untersuchung der IL-6-Konzentration in den Zellüberständen aller drei Versuchsgruppen nach LPS- oder LPS+IL-33-Stimulation (Abb. 29) zeigt eine signifikant gesteigerte IL-6-Sekretion bei allen drei Zellgruppen (KO-CLPF, MC-CLPF, MCS-CLPF) auf LPS sowie auf LPS und IL-33. Die Kostimulation mit IL-33 bewirkt keinen additiven Effekt auf die IL-6-Sekretion. Nach 24 h reagieren MC-CLPF mit der stärksten IL-6-Sekretion. Nach 48 h reagieren alle CLPF-Gruppen mit einer ähnlich starken IL-6-Sekretion.

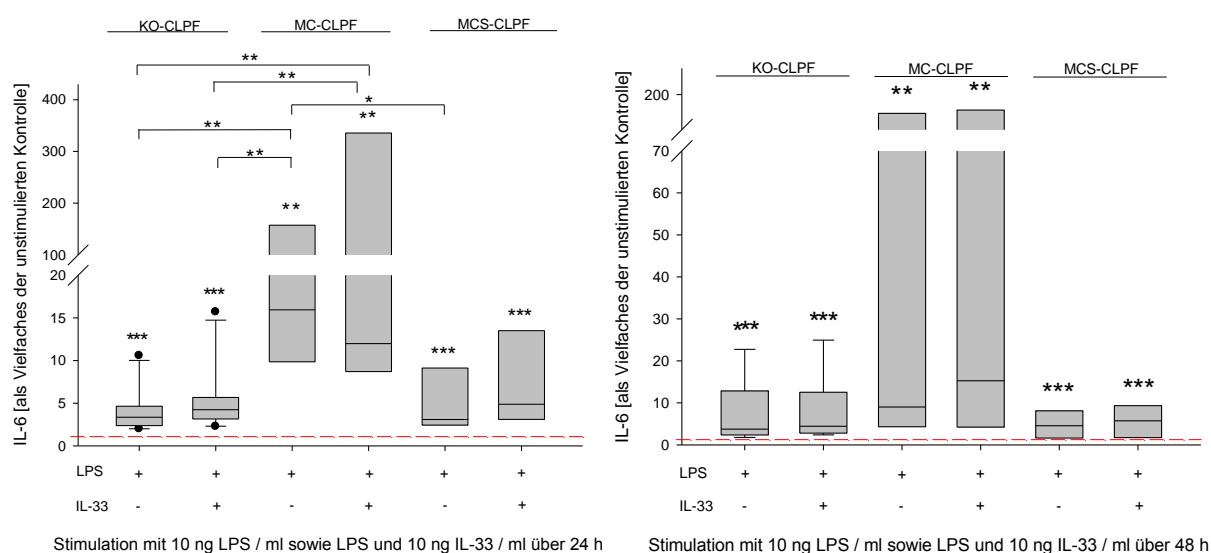


Abbildung 29: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF, MC-CLPF, MCS-CLPF mit LPS, LPS+IL-33

KO- (n=10), MC- (n=6), und MCS-CLPF (n=7) wurden mit LPS (10 ng/ml) oder LPS und IL-33 (10 ng/ml) stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h (linke Abbildung) und 48 h (rechte Abbildung) abgenommen und mittels ELISA die IL-6-Konzentration untersucht. KO steht für Kontrolle, MC steht für Morbus Crohn und MCS steht für Morbus Crohn Stenose. Dargestellt ist der Anstieg der Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.



## IL-8-Antwort nach 24 h und nach 48 h

Die Untersuchung der IL-8-Konzentrationen in den Zellüberständen von KO-CLPF, MC-CLPF und MCS-CLPF nach Stimulation mit LPS oder LPS+IL-33 (Abb. 30) zeigt ein ähnliches Ergebnis wie das Ergebnis der Untersuchung auf IL-6. Alle CLPF-Gruppen lassen sich durch LPS sowie durch LPS und IL-33 signifikant stimulieren. MC-CLPF reagieren nach 24 h mit der stärksten IL-8-Sekretion (Steigerung auf das 10-100-fache), während KO- und MCS-CLPF eine Steigerung der IL-8-Sekretion auf ungefähr das 4-fache zeigen. Im Gegensatz zu dem Ergebnis nach 24 h lassen sich nach 48 h wie bei der IL-6-Antwort auch keine größeren Unterschiede mehr zwischen den IL-8-Konzentrationen der CLPF-Gruppen feststellen. KO-, MC- und MCS-CLPF reagieren mit einer ähnlich starken IL-8-Sekretion nach 48 h.

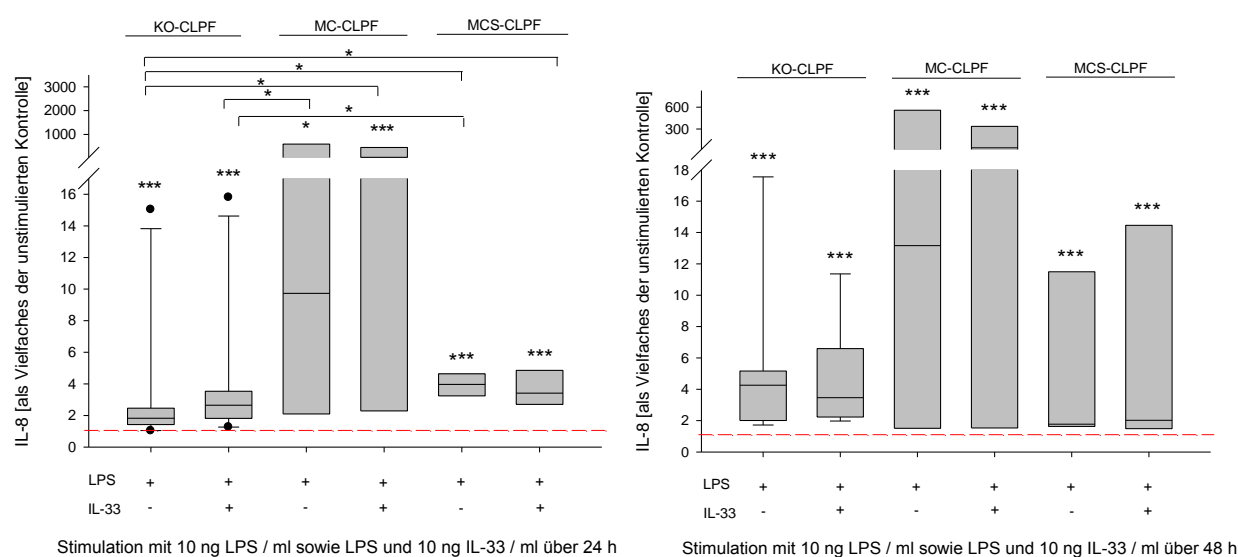


Abbildung 30: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF, MC-CLPF, MCS-CLPF mit LPS, LPS+IL-33

KO- (n=10), MC- (n=6), und MCS-CLPF (n=6) wurden mit LPS (10 ng/ml) oder LPS und IL-33 (10 ng/ml) stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h (linke Abbildung) und 48 h (rechte Abbildung) abgenommen und mittels ELISA die IL-8-Konzentration untersucht. Dargestellt ist der Anstieg der Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

### 4.5.3 Stimulation von KO-, MC- und MCS-CLPF mit CpG-ODN und CpG-ODN+IL-33

#### IL-6-Antwort nach 24 h

Die dargestellten Diagramme (Abb. 31) zeigen die IL-6-Konzentrationen von KO-, MC- und MCS-CLPF nach Stimulation mit CpG-ODN oder CpG-ODN und IL-33. Nach 24 h zeigt sich die stärkste, signifikant gesteigerte IL-6-Sekretion bei KO-CLPF (auf das Doppelte). MC-CLPF lassen sich kaum und MCS-CLPF gar nicht durch CpG-ODN stimulieren. Auffällig ist, dass MC-CLPF sowohl nach 24 h als auch nach 48 h (hier signifikant) lediglich auf die Stimulation mit CpG-ODN und IL-33 mit einer signifikanten Steigerung der IL-6-Sekretion auf ca. das 2,5-fache reagieren. Die Zugabe von IL-33 zum CpG-ODN bewirkt, die IL-6-Sekretion betreffend, bei KO- und MCS-CLPF keine Änderung, bei MC-CLPF scheint es additiv zu wirken. Nach 48 h zeigt sich unverändert zu 24 h, dass MC-CLPF mit einer stärkeren IL-6-Sekretion reagieren als MCS-CLPF.

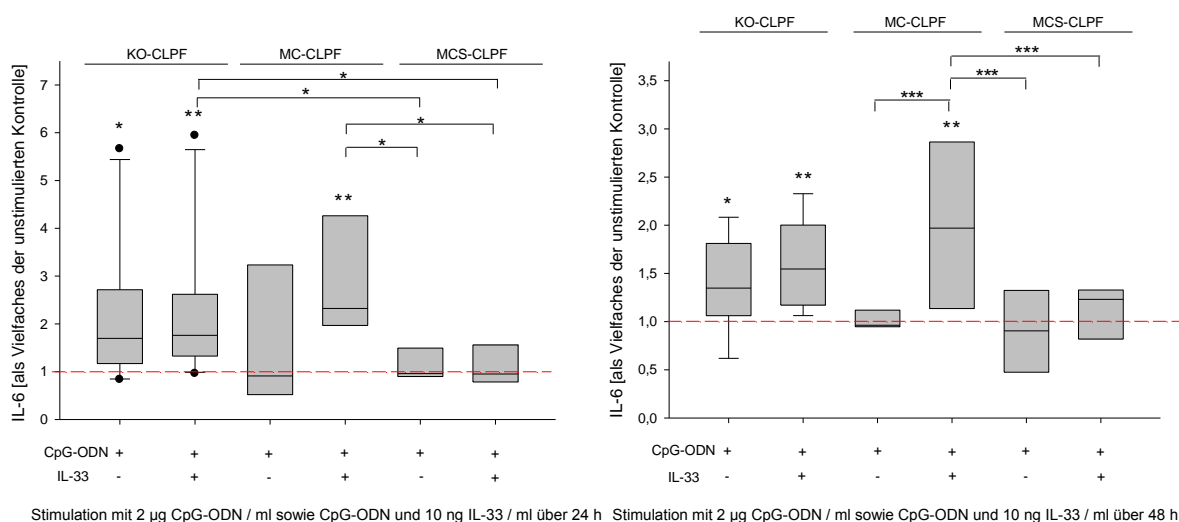


Abbildung 31: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF, MC-CLPF, MCS-CLPF mit CpG ODN, CpG-ODN+IL-33

KO- (n=10), MC- (n=6), und MCS-CLPF (n=7) wurden mit CpG-ODN (2 µg/ml) oder CpG-ODN und IL-33 (10 ng/ml) stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h (linke Abbildung) und 48 h (rechte Abbildung) abgenommen und mittels ELISA die IL-6-Konzentration untersucht. Dargestellt ist der Anstieg der Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

## IL-8-Antwort nach 24 h und nach 48 h

KO-, MC- und MCS-CLPF wurden über 24 h und 48 h mit CpG-ODN oder CpG-ODN und IL-33 stimuliert. KO-CLPF reagieren mit der stärksten IL-8-Sekretion auf ungefähr das 1,5-2-fache (Abb. 32), MCS-CLPF reagieren gar nicht, während MC-CLPF sich nur durch CpG-ODN+IL-33 stimulieren lassen, jedoch auch nicht signifikant. Insgesamt ähnelt das Ergebnis qualitativ der IL-6-Sekretion nach 24 h. Nach 48 h zeigt keine der CLPF-Gruppen eine signifikante Steigerung der IL-8-Sekretion. Zudem reagieren alle CLPF-Gruppen mit einer quantitativ ähnlich starken IL-8-Sekretion.

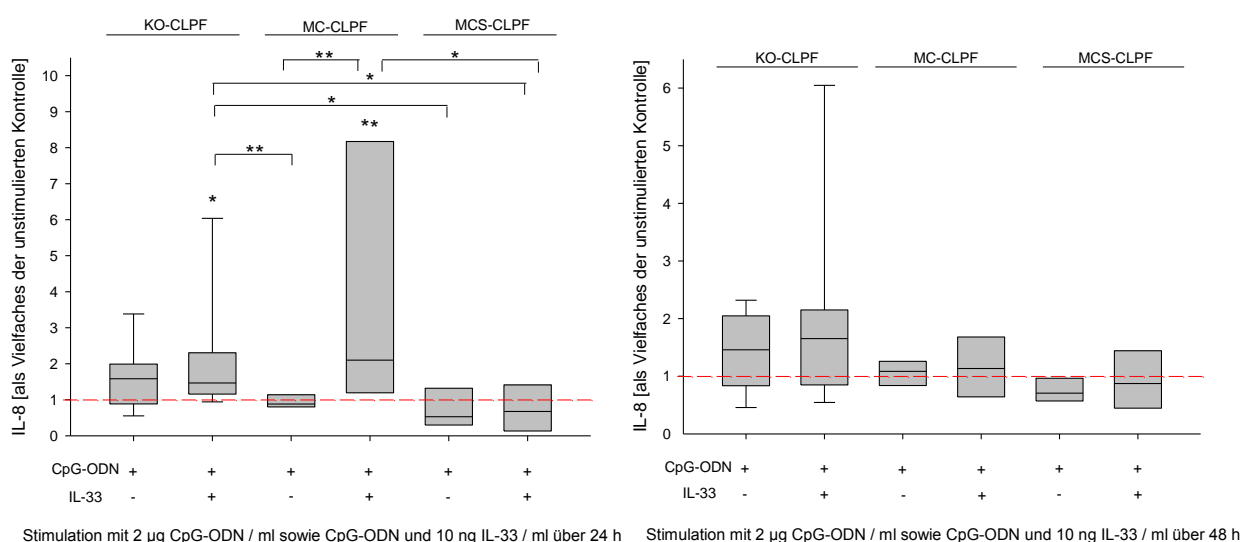


Abbildung 32: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF, MC-CLPF, MCS-CLPF mit CpG ODN, CpG-ODN+IL-33

KO- (n=9), MC- (n=6), und MCS-CLPF (n=6) wurden mit CpG-ODN (2 µg/ml) oder CpG-ODN und IL-33 (10 ng/ml) stimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h (linke Abbildung) und 48 h (rechte Abbildung) abgenommen und mittels ELISA die IL-8-Konzentration untersucht. Dargestellt ist der Anstieg der Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

#### 4.5.4 Zusammenfassung

Bei KO-CLPF induzieren TNF, LPS, CpG-ODN sowie die Kostimulationen TNF+IL-33, LPS+IL-33, CpG-ODN+IL-33 eine signifikant gesteigerte IL-6- und IL-8-Produktion. Am stärksten lassen sie sich durch TNF stimulieren (auf das ca. 100-fache). Die Zugabe von IL-33 zu TNF, LPS und CpG-ODN wirkt sich nicht additiv auf die IL-6-/IL-8-Sekretion aus. Es bestehen keine Unterschiede zwischen der IL-6- und der IL-8-Antwort.

MC-CLPF lassen sich ebenfalls durch TNF, LPS sowie durch die Kostimulationen TNF+IL-33, LPS+IL-33, CpG-ODN+IL-33 jeweils signifikant stimulieren. MC-CLPF lassen sich nicht durch CpG-ODN stimulieren. Wie KO-CLPF lassen sich auch MC-CLPF am stärksten durch TNF stimulieren (Anstieg der IL-6- bzw. IL-8-Konzentration auf ca. das 150-fache bzw. das 700-fache). Insgesamt lässt sich bei MC-CLPF kein additiver Effekt durch die Kostimulation mit IL-33 erzielen, jedoch bewirkt die Zugabe von IL-33 zu CpG-ODN eine signifikante IL-6-/IL-8-Sekretion bei MC-CLPF, die durch CpG-ODN alleine nicht erreicht wird. Quantitativ sind die IL-8-Konzentrationen jeweils höher als die IL-6-Konzentrationen. Vergleicht man das Reaktionsverhalten von KO-CLPF mit dem von MC-CLPF lässt sich bei MC-CLPF insgesamt eine quantitativ höhere IL-6-/IL-8-Sekretion beobachten.

MCS-CLPF lassen sich durch TNF, LPS sowie durch die Kostimulationen TNF+IL-33, LPS+IL-33 stimulieren. MCS-CLPF sind nicht durch CpG-ODN sowie CpG-ODN+IL-33 stimulierbar. Wie die anderen beiden CLPF-Gruppen wird auch bei MCS-CLPF durch TNF der stärkste stimulatorische Effekt auf die Zytokinsekretion erzielt (Anstieg auf das ca. 500-fache). Die zusätzliche Zugabe von IL-33 wirkt sich nicht additiv auf die IL-6-/IL-8-Konzentrationen aus. Insgesamt reagieren MCS-CLPF unterschiedlich im Vergleich zu KO- und MC-CLPF.

Interessanterweise lassen sich nach 24 h häufig Unterschiede zwischen KO-, MC- und MCS-CLPF mit einer höheren IL-6-/IL-8-Sekretion bei MC-CLPF feststellen, die nach 48 h jedoch nicht mehr nachweisbar sind.

## 4.6 LPS+IL-33 Dosisabhängigkeit

### 4.6.1 Stimulation von KO-CLPF mit LPS und steigender Dosis von IL-33

IL-6-Antwort nach 24 h und nach 48 h

KO-CLPF wurden mit LPS allein sowie LPS und steigenden Konzentrationen von IL-33 stimuliert. Nach 24 und 48 Stunden Inkubation wurden die entnommenen Zellüberstände mittels ELISA auf IL-6 untersucht. Es wird deutlich (Abb. 33), dass die Stimulation nach 24 h und nach 48 h zu einer signifikant gesteigerten Sekretion von IL-6 führt. Tendenziell zeigt sich eine Zunahme der IL-6-Sekretion durch gesteigerte IL-33-Konzentrationen und LPS, jedoch ist diese nicht signifikant. Ferner übt die Zugabe von IL-33 zum LPS keinen signifikant additiven Effekt aus. Eine Zeitabhängigkeit lässt sich nicht erkennen, die IL-6-Sekretion sieht nach 48 h qualitativ sowie quantitativ ähnlich wie nach 24 h aus.

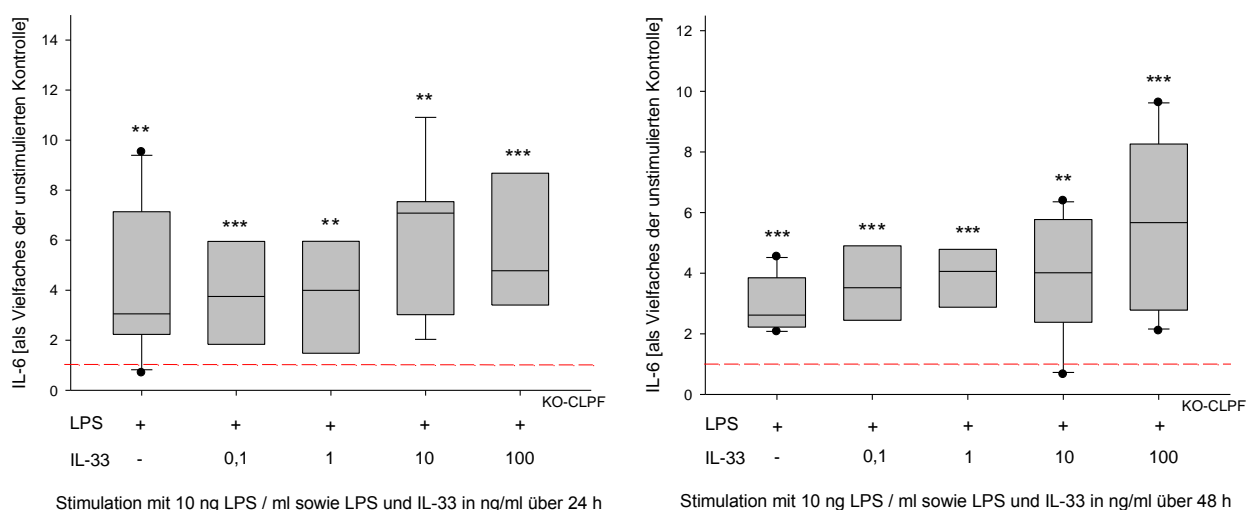


Abbildung 33: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF mit LPS und LPS plus steigender Konzentration von IL-33

KO-CLPF wurden mit LPS (10 ng/ml), n=10 oder mit LPS und steigenden Konzentrationen von IL-33 [0,1 ng/ml (n=6), 1 ng/ml (n=6), 10 ng/ml (n=9), 100 ng/ml (n=8)] kostimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h (linke Abbildung) und nach 48 h (rechte Abbildung) abgenommen und mittels ELISA die IL-6-Konzentration untersucht. Dargestellt ist der Anstieg der Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

## IL-8-Antwort nach 24 h und nach 48 h

KO-CLPF wurden mit LPS oder mit LPS zusammen mit steigenden Konzentrationen von IL-33 über 24 h und 48 h stimuliert. Die Zellüberstände wurden mittels ELISA auf IL-8 untersucht. Die Untersuchung der IL-8-Antwort zeigt (Abb. 34), dass eine Stimulation mit LPS+IL-33 in steigenden Konzentrationen zu einer signifikant gesteigerten IL-8-Sekretion bei KO-CLPF nach 24 h und nach 48 h führt. Es zeigt sich eine tendenzielle Zunahme der IL-8-Sekretion durch steigende IL-33-Konzentrationen plus LPS im Vergleich zu LPS allein, jedoch ist diese nicht signifikant. Die IL-8-Sekretion verhält sich im Wesentlichen ähnlich der IL-6-Sekretion, mit dem Unterschied, dass die IL-8-Sekretion quantitativ etwas höher ist (IL-8-Steigerung auf ca. das 8-10-fache, IL-6-Steigerung auf das ca. 4-fache) als die IL-6-Sekretion. Das Ergebnis nach 48 h ähnelt qualitativ sowie quantitativ dem nach 24 h.

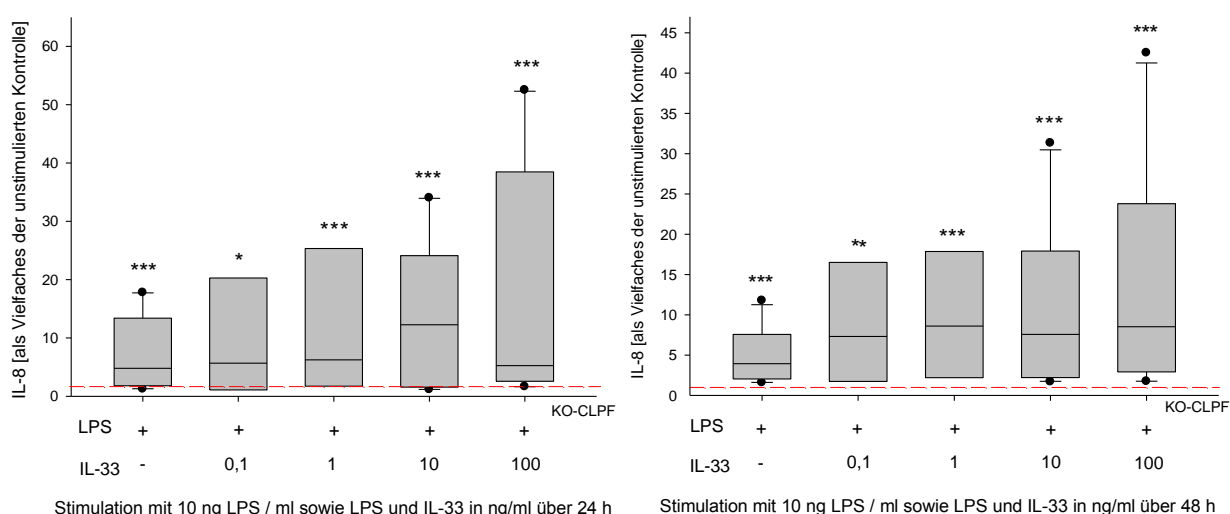


Abbildung 34: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF mit LPS und LPS plus steigende Konzentrationen von IL-33

KO-CLPF wurden mit LPS (10 ng/ml), (n=11) oder mit LPS und steigenden Konzentrationen von IL-33 [0,1 ng/ml (n=8), 1 ng/ml (n=8), 10 ng/ml (n=12), 100 ng/ml (n=10)] kostimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h (linke Abbildung) und nach 48 h (rechte Abbildung) abgenommen und mittels ELISA die IL-8-Konzentration untersucht. Dargestellt ist der Anstieg der Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

## 4.6.2 Stimulation von MC-CLPF und MCS-CLPF mit LPS und steigender Dosis von IL-33

### IL-6-Antwort nach 24 h und nach 48 h

Die Untersuchung der IL-6-Antwort nach Stimulation von MC-CLPF und MCS-CLPF mit LPS sowie mit LPS und steigenden Konzentrationen von IL-33 (Abb. 35) zeigt ein etwas anderes Verhalten als das der KO-CLPF. MC- und MCS-CLPF reagieren auf LPS und LPS mit steigenden Konzentrationen von IL-33 mit einer signifikant gesteigerten IL-6-Sekretion (auf ca. das 6-fache). Eine Dosisabhängigkeit von IL-33 bezüglich der IL-6-Sekretion besteht nicht. Die IL-6-Sekretion nach Zugabe von IL-33 ist nicht signifikant höher als nach alleiniger LPS-Stimulation. Die Abweichung vom Mittelwert ist bei den MCS-CLPF-Werten insgesamt geringer als bei den MC-CLPF-Werten. Zwischen der IL-6-Sekretion von MC-CLPF und der von MCS-CLPF bestehen keine signifikanten Unterschiede. Das Reaktionsverhalten nach 48 h ähnelt qualitativ dem nach 24 h.

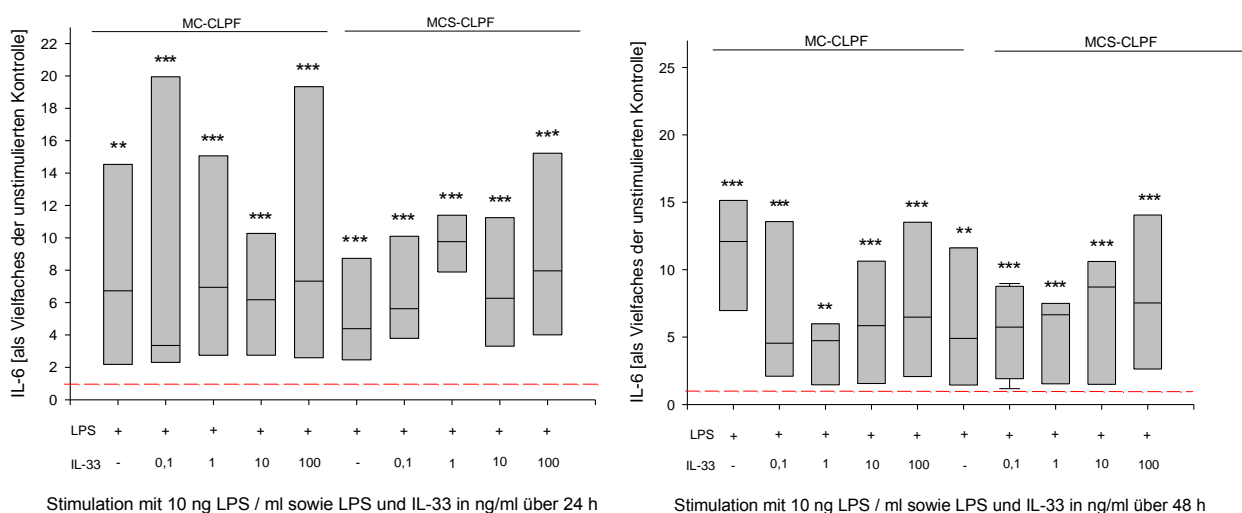


Abbildung 35: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der MC-CLPF und MCS-CLPF mit LPS und LPS plus steigender Konzentration von IL-33

MC-CLPF und MCS-CLPF wurden mit LPS (10 ng/ml), (n=8) oder mit LPS und steigenden Konzentrationen von IL-33 [0,1 ng/ml (n=6), 1 ng/ml (n=6), 10 ng/ml (n=8), 100 ng/ml (n=7)] kostimuliert, die Zellüberstände wurden nach 24 h (linke Abbildung) und nach 48 h (rechte Abbildung) abgenommen und mittels ELISA die IL-6-Konzentration untersucht. Dargestellt ist der Anstieg der Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.

## IL-8-Antwort nach 48 h

Die IL-8-Antwort von MC- und MCS-CLPF nach Stimulation mit LPS oder LPS+IL-33 in steigenden Konzentrationen (Abb. 36) zeigt nach 48 h ein ähnliches Verhalten wie die IL-6-Antwort nach 24 h und nach 48 h. MC- und MCS-CLPF reagieren auf die Stimulationen mit signifikant gesteigerter IL-8-Sekretion nach 48 h. Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen Dosis von IL-33 und IL-8-Sekretion. Insgesamt streuen die IL-8-Werte stärker als die IL-6-Werte der KO-CLPF. Die Zytokinantwort nach 24 h ähnelt qualitativ der nach 48 h, sodass hier auf ihre Darstellung verzichtet wird.

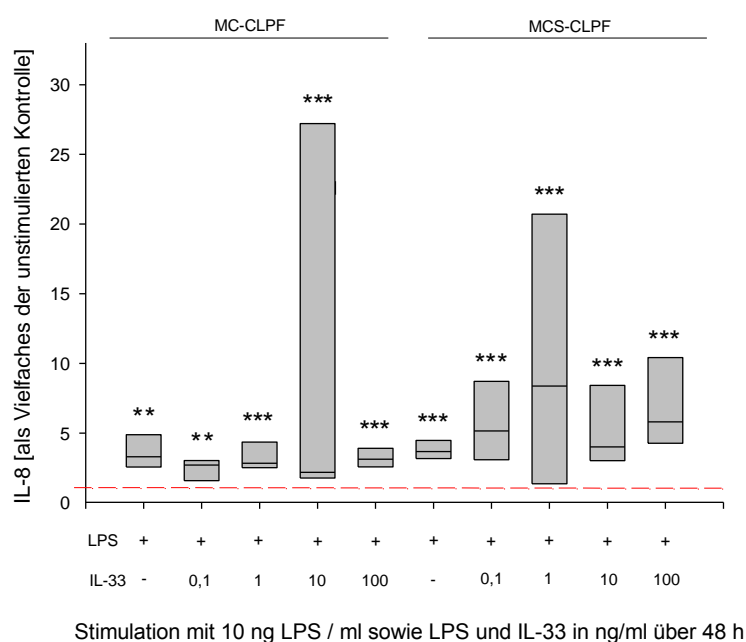


Abbildung 36: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der MC-CLPF und MCS-CLPF mit LPS und LPS plus steigender Konzentration von IL-33

MC-CLPF und MCS-CLPF wurden mit LPS (10 ng/ml), (n=7) oder mit LPS und steigenden Konzentrationen von IL-33 [0,1 ng/ml (n=6), 1 ng/ml (n=6), 10 ng/ml (n=8), 100 ng/ml (n=7)] kostimuliert, die Zellüberstände wurden nach 48 h abgenommen und mittels ELISA die IL-8-Konzentration untersucht. Dargestellt ist der Anstieg der Zytokinsekretion bezogen auf die nicht stimulierte Kontrolle. Die unstimulierte Negativkontrolle entspricht 1. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche mit der Kontrolle angegeben, bei denen ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Die statistische Signifikanz ist \* mit  $p \geq 0,01$  aber  $< 0,05$ , \*\* mit  $p \geq 0,001$  aber  $< 0,01$  und \*\*\* mit  $p < 0,001$  angegeben.



### 4.6.3 Zusammenfassung

Betrachtet man zusammenfassend die Unterschiede zwischen KO-, MC- und MCS-CLPF nach Stimulation mit LPS sowie LPS mit steigenden Konzentrationen von IL-33 lässt sich Folgendes sagen:

KO-CLPF, MC-CLPF und MCS-CLPF reagieren nach 24 h und nach 48 h mit einer signifikant gesteigerten IL-6- und IL-8-Sekretion. Die IL-8-Sekretion ist bei KO-CLPF quantitativ etwas stärker (Anstieg auf ca. das 10-fache) ausgeprägt als die IL-6-Sekretion (Anstieg auf das ca. 5-fache). Bei MC- und MCS-CLPF bestehen keine größeren quantitativen Unterschiede zwischen der IL-6 und IL-8-Sekretion. Durch die Zugabe von IL-33 zu LPS wird bei MC- und MCS-CLPF die Zytokinausschüttung nicht signifikant gesteigert. Jedoch scheint sich bei KO-CLPF eine tendenzielle Zunahme der IL-6/IL-8-Sekretion durch steigende IL-33-Konzentrationen im Vergleich zu der Stimulation mit LPS allein abzuzeichnen. Diese ist jedoch nicht signifikant. Insgesamt bestehen keine Unterschiede zwischen den Ergebnissen nach 24 h und denen nach 48 h.

### 4.7 Zusammenfassung der Effekte von IL-33 bei CLPF

KO-, MC-, MCS- sowie CU-CLPF exprimieren ST2/IL-1  $R_4$ . CU-CLPF exprimieren den Rezeptor am stärksten. Bei der Untersuchung von LPMZ auf ST2/IL-1  $R_4$  stellte sich heraus, dass MC-LPMZ ST2/IL-1  $R_4$  stärker exprimieren als KO- und CU-LPMZ.

Bei Stimulation von KO-, MC- und MCS-CLPF mit steigenden Dosen von IL-33 zeigten lediglich KO-CLPF eine Dosisabhängigkeit der induzierten IL-6-Sekretion. Weder bei der IL-33-induzierten IL-8-Sekretion der CLPF noch bei MC- und MCS-CLPF konnte eine Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden. Interessanterweise war der IL-33-abhängige IL-6-Anstieg bei KO-CLPF stärker als die IL-8-Antwort, während sich bei MC- und MCS-CLPF keine Unterschiede zwischen IL-6 und IL-8 zeigten. Ferner wiesen KO-CLPF nach 48 h höhere IL-6 und IL-8-Konzentrationen nach Stimulation mit niedrigen IL-33-Konzentrationen auf als nach 24 h. MCS-CLPF dagegen zeigten höhere IL-6/IL-8-Konzentrationen nach

24 h als nach 48 h. MC-CLPF zeigten keinen Unterschied im Reaktionsverhalten nach 24 h und nach 48 h.

In den Kostimulationsversuchen zeigt sich bei KO- und MCS-CLPF kein additiver Effekt durch die Zugabe von IL-33. Bei MC-CLPF dagegen wirkt sich die Kostimulation mit IL-33 insofern additiv aus, als dass die Stimulation mit CpG-ODN zu keiner gesteigerten IL6-/IL-8-Sekretion führt, während die Kombination mit IL-33 in einer signifikant gesteigerten IL-6/IL-8-Sekretion mündet. KO- und MCS-CLPF weisen keine quantitativen Unterschiede zwischen der IL-6- und IL-8-Antwort auf, MC-CLPF zeigen höhere IL-8- als IL-6-Konzentrationen. Interessanterweise reagieren MC-CLPF nach 24 h häufig mit einer stärkeren Zytokinantwort als KO-CLPF, die nach 48 h jedoch nicht mehr nachweisbar ist. Bei MCS- und KO-CLPF zeigen sich keine größeren Unterschiede nach 24 h und nach 48 h.

Die Untersuchung der Dosisabhängigkeit nach Stimulation mit LPS und steigenden Dosen von IL-33 erbringt folgende Ergebnisse:

KO-CLPF reagieren nach Zugabe von IL-33 zum LPS mit einer Steigerung der IL6-/IL-8-Sekretion, die jedoch nicht signifikant ist. MC- und MCS-CLPF zeigen keine Veränderung der IL-6-/IL-8-Antwort nach Kostimulation mit IL-33 in steigenden Konzentrationen. Die IL-8-Konzentrationen sind bei KO-CLPF höher als die IL-6-Konzentrationen, bei MC- und MCS-CLPF zeigen sich kaum Unterschiede. Zudem bestehen keine größeren Unterschiede zwischen der Zytokinantwort nach 24 h und der nach 48 h.

Die Analyse der Modulation der NF- $\kappa$ B p65- und der p-ERK 42/44-Aktivierung durch TNF, LPS, IL-33, CpG-ODN in KO- und MCS-CLPF zeigt folgendes Ergebnis:

Sowohl KO- als auch MCS-CLPF führen nach Stimulation zu keiner gesteigerten NF- $\kappa$ B p65-Aktivierung. Außerdem zeigen stimulierte KO-CLPF keine verstärkte p-ERK 42/44-Aktivierung. Im Western Blot konnte jedoch eine verstärkte p-ERK 42/44-Aktivierung in MCS-CLPF nach Stimulation mit TNF+IL-33 sowie CpG-ODN+IL-33 nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte dieser Effekt durch IL-33 und TNF sowie CpG-ODN alleine nicht erzielt werden.

## 4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Vorexperimente zur Etablierung einer Positivkontrolle zeigten, dass KO-CLPF auf TNF, LPS und CpG in den gewählten Dosierungen mit gesteigerter IL-6- und IL-8-Antwort reagieren. Vergleicht man dieses Verhalten mit der Reaktion von MC- und MCS-CLPF auf die Positivkontrollen, zeigten sich ähnliche Ergebnisse nach Stimulation mit TNF und LPS. Anders als KO-CLPF reagieren MC- und MCS-CLPF auf CpG-ODN nicht mit gesteigerter IL-6- und IL-8-Sekretion.

Bezüglich der Unterschiede im Reaktionsverhalten untereinander fällt auf, dass MC-CLPF mit einer signifikant stärkeren IL-6/IL-8-Sekretion auf LPS nach 24 h reagieren als KO- und MCS-CLPF.

Nach den Vorexperimenten lag das Augenmerk dieser Arbeit auf dem noch wenig untersuchten Zytokin IL-33. Die IL-6/IL-8-Sekretion von KO- und MC- sowie MCS-CLPF sollte nach Stimulation mit dem Zytokin untersucht werden. Voraussetzung für die Experimente war jedoch zunächst der IL-33-Rezeptor-Nachweis auf CLPF. Dieser konnte hier erstmals nachgewiesen werden, interessanterweise zeigte sich dieser stärker auf CU-CLPF als auf MC- und KO-CLPF exprimiert. Mit den anschließend folgenden Stimulationsexperimenten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass KO-CLPF nach Stimulation mit steigenden Konzentrationen von IL-33 signifikant mehr IL-6 und IL-8 als die unstimulierte Kontrolle sezernieren. Dabei ist leidglich die IL-6-Antwort von KO-CLPF dosisabhängig. Der Faktor Zeit beeinflusste das Stimulationsergebnis nicht. Ähnlich wie KO-CLPF reagieren auch MC- und MCS-CLPF auf IL-33-Stimulation mit signifikant gesteigerter IL-6- und IL-8-Sekretion, jedoch anders als KO-CLPF ohne Dosisabhängigkeit. Die Zeitkomponente wirkte sich auch hier nicht auf das Ergebnis aus. Insgesamt konnten mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, bis auf die lediglich bei KO-CLPF nachweisbare dosisabhängige IL-6-Sekretion, keine größeren signifikanten Unterschiede im IL-6/IL-8-Sekretionsmuster von KO-, MC- und MCS-CLPF nach IL-33-Stimulation nachgewiesen werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Effekte der TLR-Liganden auf CLPF

Zu Beginn dieser Arbeit wurden KO-, MC- und MCS-CLPF mit den Positivkontrollen TNF, LPS und CpG-ODN stimuliert. Da bereits bekannt ist, dass humane- und tierische Fibroblasten in Zellkultur auf Stimulation mit Bakterienbestandteilen und Viren mit einer gesteigerten Sekretion von IL-6 und IL-8 reagieren [174, 201-203], war das Ergebnis, dass KO-, MC- und MCS-CLPF mit einer signifikant gesteigerten IL-6/IL-8-Sekretion nach Stimulation mit TNF und LPS reagieren, nicht überraschend [174, 197, 204-206].

#### 5.1.1 MC-CLPF reagieren auf Stimulation mit LPS nach 24 h mit stärkerer IL-6/IL-8-Sekretion als MCS- und KO-CLPF

Die Stimulation mit TNF und LPS bewirkt sowohl nach 24 h als auch nach 48 h eine signifikant gesteigerte IL-6- und IL-8-Sekretion in KO-, MC- und MCS-CLPF im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Unter allen drei CLPF-Gruppen scheinen MC- und MCS-CLPF tendenziell mit einer stärkeren IL-6- und IL-8-Sekretion zu reagieren als KO-CLPF, jedoch sind die Unterschiede nicht signifikant. Dieses Ergebnis kann durch zahlreiche Studien bestätigt werden [204, 207]. Interessant ist jedoch, dass die Stimulation mit LPS in MC-CLPF nach 24 h eine deutlich stärker ausgeprägte Steigerung der IL-6- und IL-8-Sekretion hervorruft als in KO- und MCS-CLPF. Ursache dafür könnte sein, dass bei Morbus Crohn ein immunologisches Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen vorliegt und dieses bei erkrankten Patienten nach Exposition des Darmlumens mit Bakterienbestandteilen (LPS) zu einer verstärkten proinflammatorischen Zytokinsekretion führt, die durch eine mögliche Defizienz der antiinflammatorischen Zytokine bedingt ist [206]. Ferner ist aus tierexperimentellen Untersuchungen bekannt, dass Bakterienbestandteile bzw. die eigene Bakterienflora des Darms an der Pathogenese von Morbus Crohn beteiligt sind [208, 209]. Vor diesem Hintergrund ist die starke IL-6/IL-8-Sekretion in MC-CLPF nach LPS-Stimulation plausibel. Eine mögliche Erklärung dieses

Ergebnisses auf Proteinebene könnte die bereits in Ruhe verstärkte Zytokinsekretion von MC-CLPF sein [210-214]. Passend zu dieser konnten weitere Untersuchungen erhöhte IL-6- sowie IL-8-Konzentrationen in Schleimhautbiopsien, insbesondere in der Lamina propria, aus dem Colon von MC-Patienten im Vergleich zu denen von gesunden Patienten, nachweisen [52]. Im Colitis-Mausmodell wurden die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Dort konnte gezeigt werden, dass CLPF aus entzündeter Schleimhaut bereits in Ruhe eine stärkere IL-6-Sekretion aufweisen als CLPF aus gesunden Kontroll-Tieren und diese nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  in CLPF von kranken Tieren stärker ansteigt als in denen von gesunden Kontrollen [215]. Ähnliche Ergebnisse erzielten Studien bei rheumatoider Arthritis: Werden synoviale Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis 24 h lang mit Peptidoglykan stimuliert, reagieren diese nach 24 h mit einer stärkeren IL-6-Antwort als gesunde Kontroll-Synovial-Fibroblasten [216]. Weitere Untersuchungen an CLPF von Morbus Crohn Patienten zeigten, dass diese mit einer gesteigerten dosisabhängigen Sekretion von IL-6 und IL-8 im Vergleich zu unstimulierten MC-CLPF auf verschiedene Stimulanzen wie IFN- $\gamma$ , TNF, IL-22, IL-19 reagieren [217]; jedoch wurde in diesen Untersuchungen leider kein Vergleich zu CLPF aus gesunden Kontroll-Patienten durchgeführt [218]. Ferner könnte die erhöhte Vulnerabilität von MC-CLPF auf externe Reize im Vergleich zu KO-CLPF eine weitere Erklärung dafür, dass MC-CLPF mit einer stärkeren IL-6-Sekretion auf LPS antworten als KO- und MCS-CLPF, sein [219-221]. Die Vulnerabilität kommt unter anderem durch eine erhöhte Permeabilität der Darmmukosa von CED-Patienten zustande. Diese erklärt die überschießende IL-6- und IL-8-Antwort auf LPS [209]. Weiterhin könnte die Konfluenz der stimulierten Fibroblasten einen Einfluss auf die Zytokinsekretion gehabt haben. Konfluent gewachsene Fibroblasten sezernieren weniger IL-6 als nicht konfluent gewachsene Fibroblasten [222]. Bei der Zellkultivierung im Rahmen dieser Arbeit ist aufgefallen, dass MC-CLPF schneller nekrotisch geworden sind als KO-CLPF. Möglicherweise führte dies zu einer verminderten Konfluenz bei MC-CLPF, die die gesteigerte IL-6-Sekretion erklärt. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass LPS in MC-CLPF außer TLR4 ebenso TLR2 aktiviert hat und dadurch zur verstärkten IL-6- und IL-8-Sekretion

führte [223]. Darüber hinaus könnte noch eine negative Regulation über *suppressor of cytokine signalling* (SOCS) eine Ursache für den relativ niedrigeren Anstieg der IL-6/IL-8-Sekretion nach 48 h im Vergleich zu 24 h nach LPS-Stimulation in MC-CLPF sein. SOCS werden durch Reize wie z. B. LPS und CpG-ODN induziert. Sie agieren im Sinne einer negativen Feedback-Schleife, um eine zu starke Zytokinsekretion zu begrenzen [224-227]. Schließlich könnte in MC-CLPF nach 48 h eine Desensibilisierung, auch unter dem Begriff „Endotoxin-Toleranz“ bekannt, auf LPS stattgefunden haben [228-230]. Ein weiteres Protein, dessen Regulation in der inflammatorischen Antwort von MC-CLPF verändert sein könnte und die starke IL-6/IL-8-Sekretionssteigerung nach 24 h erklären könnte, ist *high-mobility group protein B1* (HMGB1). HMGB1 interagiert mit TLR4 und führt zu einer verstärkten proinflammatorischen Antwort [231].

### **5.1.2 MC- und MCS-CLPF reagieren nicht mit gesteigerter IL-6/IL-8-Sekretion auf CpG-ODN**

Eine der verwendeten Positivkontrollen in dieser Arbeit ist CpG-ODN. KO-CLPF reagieren wie erwartet [151, 154, 232, 233] auf die Stimulation mit CpG-ODN mit einer signifikant gesteigerten IL-6/IL-8-Sekretion. Interessanterweise ist dies bei MC- und MCS-CLPF nicht der Fall. Möglicherweise ist das intestinale Immunsystem in Morbus Crohn Patienten derart dysreguliert, dass CpG-ODN nicht mehr als „fremd“ erkannt werden. Dies würde insbesondere vor dem Hintergrund, dass Bakterien an der Pathogenese von Morbus Crohn beteiligt sind, plausibel erscheinen. Denkbar ist auch, dass durch die bereits in Ruhe überschießende IL-6- und IL-8-Sekretion diese Zytokinsekretionen bereits am Maximum sind und durch weitere Stimulanzen wie CpG-ODN nicht mehr signifikant gesteigert werden können. Während in tierexperimentellen Colitis-Modellen die intra-peritoneale Applikation von CpG-ODN bei vorbestehender Colitis zu einer Aggravierung der Entzündung einhergehend mit verstärkter Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen führt [234, 235], wirkt sich die prophylaktische CpG-ODN-Verabreichung vor Colitis-Induktion in einer Reduktion der Entzündung aus. Weitere tierexperimentelle Studien bestätigten einen inhibitorischen Effekt

von CpG-ODN auf Colitis [236, 237]. Diese Ergebnisse stützen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse weitestgehend, obgleich die Ergebnisse dieser Arbeit keine signifikante Suppression von IL-6 und IL-8 durch CpG-ODN präsentieren. Untersuchungen bei weiteren entzündlichen Erkrankungen wie zum Beispiel an Synovialfibroblasten bei Rheumatoider Arthritis bestätigten diese Ergebnisse. Während Stimulation mit Staphylokokken-Peptidoglykan bei diesen zu verstärkter IL-6- und IL-8-Sekretion führte, war dies bei Stimulation mit CpG-ODN nicht der Fall [238]. In Zusammenschau der Ergebnisse und der Studienlage sowie der Tatsache, dass die Hygiene als einer der ätiopathogenetischen Faktoren von Morbus Crohn diskutiert wird, kann spekuliert werden, dass starke Keimfreiheit die Entstehung von CED begünstigt, während CpG-ODN protektiv wirken und deshalb in der manifesten Colitis nicht zu proinflammatorischer Antwort, wie bei den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, führen [235]. Möglicherweise war die in dieser Arbeit verwendete CpG-ODN Sequenz nicht dafür geeignet MC-CLPF adäquat zu stimulieren. Weiterhin kann die fehlende Stimulierbarkeit in einer mangelhaften TLR9-Expression auf MC-CLPF begründet liegen. Eine weitere Erklärung für das fehlende Ansprechen von MC-CLPF könnte eine Desensibilisierung durch CpG-ODN sein. In tierexperimentellen Untersuchungen bewirkt CpG-ODN in Makrophagen eine gesteigerte Zytokinsekretion, die nach fünf Tagen jedoch in Folge einer Desensibilisierung nicht mehr nachweisbar ist [235, 239]. Die Signaltransduktion über TLRs unterliegt einer komplizierten und vielfältigen Regulation, die dazu dient, eine überschießende Immunantwort auf Toxine zu verhindern. Ein Beispiel für die Regulation ist die E3 Ubiquitin-Ligase Triad3A. TLR4 und TLR9 werden durch die E3 Ubiquitin-Ligase Triad3A vermehrt ubiquitiniert und daraufhin im Proteasom abgebaut [240]. Möglicherweise weisen MC- und MCS-CLPF eine verstärkte Aktivität oder Expression von Triad3A auf, so dass durch den vermehrten Abbau im Proteasom weniger TLR9 vorhanden ist, an den CpG-ODN binden kann und es somit zu keiner IL-6/IL-8-Sekretion kommt. Eine weitere Erklärung könnte ferner die Induktion von SOCS1 und SOCS3 durch CpG-ODN sein. SOCS begrenzen mittels eines negativen *Feedback*-Mechanismus die Sekretion von Zytokinen. Eine vorangegangene Medikation mit Glukokortikoiden bei MC- und MCS-Patienten kann ebenfalls zu einer Hemmung

der Sekretion von IL-6/IL-8 nach Stimulation mit CpG-ODN geführt haben [241-245]. Wie bereits diskutiert, könnte ferner TGF- $\beta$ 1 hier einen verstärkten Abbau von MyD88 über eine verstärkte Ubiquitinierung bewirkt haben [246]. Da die TLR9-Signaltransduktion ebenso wie die TLR4-Signaltransduktion MyD88 aktiviert, ist es denkbar, dass TGF- $\beta$ 1 in MC- und MCS-CLPF zum verstärkten MyD88-Abbau führt und die Signalkaskade nach CpG-ODN-Stimulation auch hier an dieser Stelle unterbrochen wird. Dadurch kommt es zu keiner NF- $\kappa$ B-Translokation mit konsekutiv fehlender IL-6- und IL-8-Sekretion.

## **5.2 Expression des IL-33-Rezeptors**

### **5.2.1 CU-CLPF exprimieren den IL-33-Rezeptor stärker als KO-, MC- und MCS-CLPF**

Im Rahmen dieser Arbeit wird der IL-33-Rezeptor mittels Western Blot auf CLPF nachgewiesen. ST2 wurde erstmals auf T<sub>H</sub>2-Zellen sowie auf Mastzellen identifiziert [138]. Später konnte der Rezeptor unter anderem auf humanen und tierischen Fibroblasten nachgewiesen werden [247-251]. Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wird der Rezeptor erstmals auf KO-, MC-, MCS- und CU-CLPF nachgewiesen. Auffällig ist jedoch, dass CU-CLPF den Rezeptor am stärksten unter den CLPF-Gruppen exprimiert. IL-33 führt über ST2 ebenfalls zu einer T<sub>H</sub>2-Zellantwort, somit erscheint es plausibel, dass ST2 in Fibroblasten aus CU-Patienten (CU ist eine T<sub>H</sub>2-Zell-assoziierte Erkrankung [252]) stärker exprimiert wird als in Kontrollen oder dem T<sub>H</sub>1-Zell-assoziierten Morbus Crohn. Vergleichbare Studien haben ST2 in weiteren entzündlichen Erkrankungen untersucht und erzielten ähnliche Ergebnisse. Fibroblasten von Patienten, die an systemischer Fibrose leiden, exprimieren ST2 deutlich stärker als Fibroblasten aus gesunden Kontrollen [253]. ST2 wird durch Stressoren, insbesondere durch Entzündungsmediatoren wie TNF und andere proinflammatorische Zytokine, aber auch durch Bleomycin, UV-Strahlung sowie Zytokine der T<sub>H</sub>2-Zelllinie „hoch-reguliert“ [254, 255]. Daher könnte die starke ST2-Expression auf CU-CLPF auf den Einfluss der verstärkt sezernierten Entzündungsmediatoren im Colon von



CU-Patienten zurückzuführen sein. Dies wird ebenso durch eine Studie gestützt, in der die ST2-Expression auf der Cornea von Mäusen nach Exposition mit *Pseudomonas aeruginosa* signifikant stärker gewesen ist [256]. Weitere Studien, die in Schleimhautbiopsien aus dem Colon von CU-Patienten in der Immunofluoreszenz eine signifikant verstärkte Expression vom löslichen Rezeptor ST2, ausgeprägter als bei MC- oder KO-Patienten zeigten [257], stützen ebenfalls das Ergebnis. Schließlich ist ST2 bei CED insbesondere in der Lamina propria des Colons immunhistochemisch vermehrt nachweisbar, bei CU-Patienten sogar noch etwas stärker als bei MC-Patienten [258]. Diese Tatsachen stützen das Ergebnis, dass ST2 in CU-CLPF verstärkt exprimiert wird, und dass entzündliche Faktoren für diese verantwortlich sind. Möglicherweise hängt das Ausmaß der ST2-Expression vom Grad der Entzündung ab.

### **5.2.2 MC-LPMZ exprimieren den IL-33-Rezeptor stärker als KO- und CU-LPMZ**

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass außer CLPF auch humane LPMZ ST2 exprimieren. Interessanterweise exprimieren MC-LPMZ den IL-33-Rezeptor stärker als KO- und CU-LPMZ. Zahlreiche Untersuchungen konnten ST2 insbesondere auf T<sub>H</sub>2-Zellen sowie Mastzellen nachweisen [113]. Das Ergebnis ist somit mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Expression von ST2 auf T-Lymphozyten und Mastzellen in der Lamina propria des Colons zurückzuführen. Morbus Crohn ist jedoch eine T<sub>H</sub>1-Zytokin-assoziierte Erkrankung, daher erscheint es nicht plausibel, dass MC-LPMZ ST2 am stärksten exprimieren. Das Ergebnis lässt sich dennoch dadurch erklären, dass in der Lamina propria des Colons von gesunden Kontroll-Patienten ST2 überwiegend auf Epithelzellen und weniger auf LPMZ exprimiert wird [258], während in entzündeten Colonabschnitten von CU- und MC-Patienten (CU>MC) dieser überwiegend auf LPMZ exprimiert wird [258]. Dabei scheint gerade der Verlust von intestinalen Epithelzellen charakteristisch für Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa zu sein [258]. Pastorelli et al. erzielten ähnliche Ergebnisse, die das Ergebnis in dieser Arbeit bestätigen, wenn auch nur im tierexperimentellen

Modell. Sie wiesen immunhistochemisch im Colitis/Crohn-Mausmodell verstärkt ST2 auf LPMZ nach. Dabei war ST2 insbesondere in LPMZ aus entzündeten Arealen von Mäusen mit Colitis Ulcerosa oder Morbus Crohn, v. a. auf Histiozyten und Lymphozyten, nachweisbar [258]. Im Unterschied zu den hier präsentierten Ergebnissen konnte immunhistochemisch mehr ST2 in LPMZ aus CU- als aus MC-Mäusen nachgewiesen werden.

### **5.3 IL-33 stimuliert in KO-, MC- und MCS-CLPF die IL-6/IL-8-Sekretion signifikant**

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des 2005 entdeckten IL-33 auf MC-, KO- sowie MCS-CLPF zu untersuchen. Die IL-33/ST2-Achse ist besonders interessant, da sie in einer Reihe von chronischen Erkrankungen wie allergischem Asthma und rheumatoider Arthritis die Entzündung und Krankheitsentstehung fördert [140, 250, 259, 260]. In Tierexperimenten mit Herzinsuffizienz dagegen führt IL-33 zu einer Reduktion der ventrikulären Hypertrophie sowie der Fibrose [148, 261]. Zudem konnten Studien protektive Wirkungen von IL-33 auf die Schleimhautintegrität des Colons nachweisen, wie zum Beispiel die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion sowie die Epithelproliferation und Mukussekretion [129].

In dieser Arbeit sollte die Rolle von IL-33 im Kontext der Krankheitsentstehung / -förderung bei Morbus Crohn untersucht werden. Tierexperimente lieferten erste Hinweise dafür, dass dieses im Gastrointestinaltrakt einen besonderen Stellenwert einnimmt. Dort führt Stimulation mit IL-33 zu Epithelhyperplasie, Becherzellhyperplasie sowie zu einer Eosinophilen- und Neutrophilen-Infiltration in die Colon-Schleimhaut [108]. Zudem ist IL-33 und der dazugehörige Rezeptor ST2 sowohl in entzündeter Colonschleimhaut als auch im Serum von Colitis/Crohn-Mäusen verstärkt nachweisbar [258]. Nach Infliximab-Therapie sinken die IL-33-Konzentrationen im Serum und der Anteil an löslichem ST2 (welches antiinflammatorisch wirkt) steigt [258]. Aber auch bei Patienten, die an Colitis Ulcerosa oder Morbus Crohn leiden, sind Serum-ST2-Konzentrationen im

Vergleich zu Gesunden erhöht und korrelieren positiv mit der Gesamtmenge von ST2 im Darm [262]. Ferner besteht eine positive Korrelation zwischen ST2-Serumspiegel und TNF-Serumspiegel sowie dem endoskopischen und histopathologischen Befund der Darmentzündung bei MC-Patienten [262]. Somit sind für IL-33 sowohl protektive als auch schädigende Effekte beschrieben und diese deuten auf eine bedeutende Rolle von IL-33 in der Pathogenese von Morbus Crohn hin. Ziel dieser Arbeit war es, Unterschiede in der proinflammatorischen Zytokinsekretion (IL-6/IL-8) von MC-CLPF und KO-CLPF nach IL-33-Exposition aufzuzeigen, welche ggfs. Rückschlüsse auf die Pathogenese sowie auf neue Therapieansätze von Morbus Crohn zulassen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass KO-, MC- und MCS-CLPF auf die Stimulation mit IL-33 mit einer signifikant gesteigerten IL-6/IL-8-Sekretion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle reagieren. Zu erwarten war dies insofern, als IL-33 seine Wirkung über NF- $\kappa$ B ausübt. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, ist NF- $\kappa$ B an der Regulation der Transkription von IL-6 und IL-8 beteiligt [170]. Bereits in Enteritis-Tiermodellen, in denen Tiere mit IL-33 stimuliert wurden, konnten verstärkte IL-5- und IL-6-Sekretionen aus mesenterischen Lymphknoten- und Milzzellen sowie im Serum gemessen werden [258]. Kardiale Fibroblasten aus Ratten sezernieren nach Stimulation mit IL-33 ebenfalls IL-6 [247]. Ferner ist eine stärkere IL-6-Sekretion von dermalen Fibroblasten bei Patienten mit Atopischer Dermatitis im Vergleich zu unstimulierten Fibroblasten nachweisbar [263]. Weitere Untersuchungen konnten ebenso eine gesteigerte Sekretion u. a. von IL-6 und IL-8 in verschiedenen Zellen nach IL-33-Stimulation belegen [114, 264-266]. Entgegen der Erwartung zeigen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede im IL-6/IL-8-Sekretionsverhalten der CLPF-Gruppen untereinander. KO-, MC- und MCS-CLPF reagieren alle mit einer ähnlich starken IL-6/IL-8-Sekretion auf die IL-33-Stimulation. Weiterhin konnte keine Zeitabhängigkeit für die untersuchten Zeitpunkte 24 h und 48 h gezeigt werden. Eine Dosisabhängigkeit konnte lediglich für die IL-6-Sekretion von KO-CLPF nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wird durch tierexperimentelle Untersuchungen gestützt, in denen kardiale Fibroblasten aus Ratten ebenfalls dosisabhängig mit einer IL-6-Sekretion nach IL-33 Stimulation reagieren [247]. Eine mögliche

Ursache für die fehlende Dosisabhängigkeit der IL-6/IL-8-Sekretion in MC- und MCS-CLPF könnte ein zu niedrig oder zu hoch gewählter Dosisbereich sein. Weitere Untersuchungen, die Zellstimulationen mit IL-33 und nachfolgender Zytokinmessung durchführten, wurden mit gleichen Dosen durchgeführt [108, 114, 266-268]. Weiterhin ist es wahrscheinlich, dass, wenn MC- und MCS-CLPF im Ruhezustand eine verstärkte Zytokinsekretion aufweisen, es notwendig ist höhere IL-33-Konzentrationen für die Stimulation zu verwenden als bei gesunden Fibroblasten um eine signifikante Steigerung der in Ruhe bereits erhöhten IL-6- und IL-8-Sekretion zu erzielen. Möglicherweise sind MC- und MCS-CLPF mit der IL-6/IL-8-Sekretion bereits am Maximum, da sie vielleicht auf jede externe Stimulation mit einer maximalen Zytokinantwort reagieren und deshalb keine Unterschiede zwischen den IL-6/IL-8-Sekretionen auf verschiedene IL-33-Konzentrationen zeigen.

## **5.4 Einfluss von IL-33 und TLR-Liganden auf die Signaltransduktion**

### **5.4.1 p-ERK 42/44 wird in MCS-CLPF durch die Stimulation mit TNF+IL-33 sowie CpG-ODN+IL-33 verstärkt aktiviert**

Im Western Blot sollte untersucht werden, ob IL-33 die Signaltransduktion von KO- und MCS-CLPF moduliert. IL-33 ist ein Ligand für ST2 und entfaltet seine Wirkung über MAPKs wie p38, JNKs, ERK 42/44 aber auch über die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B sowie AP-1. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Aktivierung von p-ERK 42/44 sowie NF- $\kappa$ B p65 durch TNF, LPS, CpG, IL-33 sowie die Kostimulationen verändert wird. Die Stimulationen mit TNF+IL-33 sowie CpG+IL-33 haben in MCS-CLPF eine verstärkte p-ERK 42/44-Aktivierung zur Folge. Zahlreiche Studien konnten bereits zeigen, dass p-ERK 42/44 im intestinalen Gewebe (Epithelzellen aber auch in Zellen der Lamina propria), und insbesondere in Entzündung, von Morbus Crohn Patienten verstärkt aktiviert ist [269-271]. Sowohl TNF als auch IL-33 aktivieren nach Rezeptorbindung MAPK. Offenbar wirkt sich die Kostimulation additiv auf die p-ERK 42/44-Aktivierung aus.

Untersuchungen, die das Ergebnis dieser Arbeit bestätigen, fehlen bis jetzt. Bereits gezeigt werden konnte, dass Stimulation von intestinalen Epithelzellen von CU-Patienten sowie von murinen synovialen Fibroblasten mit TNF zu einer verstärkten intrazellulären Synthese von IL-33, jedoch ohne Sekretion von IL-33 führt [258, 264]. Möglicherweise übt das sich intrazellulär akkumulierende IL-33 Aktivitäten als nukleärer Transkriptionsfaktor bzw. als ein Regulator der Transkription aus, die zu verstärkten p-ERK 42/44-Aktivierung führen [135]. Das im Colon von Morbus Crohn Patienten vermehrt nachweisbare TNF könnte erklären, dass MCS-CLPF noch vor der Isolation stärker mit TNF stimuliert worden sind und dies zu einer verstärkten intrazellulären IL-33-Synthese führte. Die Signalpfade von TNF und IL-33 können sowohl in der Aktivierung von NF- $\kappa$ B als auch in der Aktivierung von AP-1 münden. Sowohl TNF als auch IL-33 wirken über TRAF6 und MAPKs, NF- $\kappa$ B und AP-1. Die verstärkte Aktivierung von p-ERK 42/44 führt wahrscheinlich durch das Zusammenspiel von TNF und IL-33, vielleicht über verschiedene Modulatoren, zu einer verstärkten Aktivierung vom MAPK-abhängigen TRAF6-Weg. Funakoshi et al. konnten in murinen Embryonal-fibroblasten eine Induktion der TRAF6-Ubiquitin-Ligase Aktivität (E3) durch IL-33 nachweisen [272]. Dadurch kommt es zur Autoubiquitinierung von TRAF-6, sodass die Signaltransduktion bei Kostimulation mit TNF zur kompensatorischen ERK1/2-Aktivierung führen könnte. Weiterhin könnte eine verstärkte Aktivität von A20 das Ergebnis erklären. Das Zinkfingerprotein A20 ist ein hemmender Regulator, der den Wirtsorganismus vor einer zu starken Immunreaktion nach Toxinkontakt und damit vor Schock schützt. In der Signaltransduktion von TLR-Rezeptoren wird TRAF6 normalerweise während der nachfolgenden NF- $\kappa$ B-Aktivierung ubiquitiniert. A20 kann TRAF6 deubiquitinieren und somit die TRAF6-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung hemmen [273]. Unterbricht man die TLR-Signalkaskade an der Stelle der TRAF6-Aktivierung, wird die IL-33-Stimulation über eine alternative Signalkaskade, beispielsweise über p-ERK 42/44, kompensatorisch verstärkt weiterlaufen. In verschiedenen Geweben von Mäusen kann A20-mRNA durch TNF induziert werden [274-276]. Möglicherweise ist dies in CLPF ebenso der Fall. Weiterhin könnte die Anwesenheit von SOCS das Ergebnis erklären. Makrophagen aus SOCS1-defizienten Mäusen synthetisieren

vermehrt proinflammatorische Zytokine nach Stimulation mit TLR-Liganden wie zum Beispiel LPS. Die Anwesenheit von SOCS1 hemmt die LPS-abhängige NF- $\kappa$ B- und STAT1-Aktivierung in Makrophagen [225]. Die meisten SOCS, auch SOCS1 und SOCS3 werden durch Zytokine, aber auch durch LPS und CpG induziert und hemmen dann durch einen negativen *Feedback*-Mechanismus die Zytokin-Signaltransduktion via JAK-STAT. Abgesehen davon haben SOCS jedoch auch einen Einfluss auf die TLR-Signaltransduktion. SOCS1 beispielsweise bindet an die p65-Untereinheit von NF- $\kappa$ B und führt durch Ubiquitinierung zu dessen Abbau, aber auch zum Abbau von MAL [224]. Angenommen die Stimulation mit CpG-ODN induziert in MCS-CLPF SOCS1, dann führt dies zum Abbau von MAL, welches normalerweise nach IL-33-Stimulation aktiviert wird und dem nachgeschalteten Signalpfad, der in der Aktivierung von NF- $\kappa$ B mündet. Kompensatorisch könnte möglicherweise die Signalkaskade über p-ERK 42/44 verstärkt aktiviert werden. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die verstärkte p-ERK 42/44-Aktivierung nach CpG+IL-33-Stimulation. Eine mögliche Ursache dafür, dass dies nur in MCS-CLPF auftritt, könnte sein, dass IL-6 und IL-8 ebenfalls SOCS1 induzieren können. Da IL-6 und IL-8 in MCS-CLPF nach Stimulation mit TNF und LPS vermehrt sezerniert werden, kann diskutiert werden, dass SOCS1 durch IL-6/IL-8 verstärkt induziert wird. Die Kostimulation von TNF+IL-33 würde über vermehrte IL-6/IL-8-Sekretion zur Induktion von SOCS1 führen. Dieses würde über p65-Ubiquitinierung NF- $\kappa$ B abbauen und gleichzeitig auch evtl. MAL abbauen. TNF und IL-33 könnten demnach nur über einen alternativen Signalpfad wirken, der sich in der verstärkten Aktivierung von p-ERK 42/44 äußert. Ein weiterer möglicher Grund für die verstärkte p-ERK 42/44-Aktivierung in MCS-CLPF könnte die Anwesenheit von NO sein. NO kann in Anwesenheit von TNF SOCS1 in humanen Monozyten induzieren [277]. Es bestehen Hinweise, dass bei Entzündungsreaktionen NO in großen Mengen lokal synthetisiert wird. Eine mögliche Rolle von NO in der Pathogenese von Krankheiten wie Rheumatoider Arthritis, Atherosklerose, aber auch in Morbus Crohn wird diskutiert [278-280]. Insofern ist es denkbar, dass MCS-CLPF vermehrt NO sezernieren, welches dann zusammen mit TNF in CLPF SOCS1 induziert und zur gleichen nachgeschalteten Reaktion, wie gerade beschrieben,

führt. SOCS-3 inhibiert die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription durch Hemmung der Assoziation von TRAF6 und *transforming growth factor- $\beta$  activated kinase 1* (TAK1) [281]. Wenn man bedenkt, dass sowohl IL-33 als auch TNF über TRAF6 ihr Signal weiterleiten, könnte es sein, dass SOCS-3 auch in diesem Fall die Interaktion zwischen TRAF6 und TAK1 hemmt, sodass es zu keiner Freisetzung von NF- $\kappa$ B kommen kann und stattdessen die Signalkaskade über eine verstärkte Aktivierung von p-ERK 42/44 weitergeleitet wird. Welche Rolle TNF dabei spielt, ist unklar. Vielleicht wird die p-ERK 42/44-Aktivierung erst dann verstärkt aktiviert, bzw. für uns im Western Blot sichtbar, wenn die TRAF6-TAK1-Interaktion sowohl in der Signalkaskade von TNF als auch in der von IL-33 gehemmt wird. Eine andere Möglichkeit ist, dass TNF erforderlich ist, um SOCS-3 in Fibroblasten zu induzieren, damit dieses als nächstes die Wirkung auf die IL-33-Signaltransduktion entfaltet. Auf eine Rolle des TNF als potenziellen SOCS-3-Induktor weisen Tierexperimente hin, bei denen TNF im Fettgewebe von adipösen Mäusen SOCS-3 induziert [282]. Wie bereits erwähnt, könnte aber auch hier zunächst die Induktion von SOCS-3 über IL-6, als Antwort auf die TNF-Stimulation, erfolgen. SOCS-3 würde dann nach IL-33-Kostimulation die TRAF6-Aktivierung hemmen und zu einer verstärkten Aktivierung von p-ERK 42/44 führen. Eine weitere mögliche Ursache für die verstärkte p-ERK 42/44-Aktivierung nach CpG+IL-33-Stimulation könnte darin begründet sein, dass CpG-ODN selbst die IL-33-Expression induzieren kann [283].

## **5.5 Kostimulation mit TLR-Liganden und IL-33**

### **5.5.1 CpG+IL-33 führt zu IL-6/IL-8-Sekretion in MC-CLPF, aber nicht in MCS-CLPF**

In Tierexperimenten mit Colitis-Modellen bewirkt die Stimulation mit CpG-ODN eine verstärkte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen [234]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden mit primären humanen CLPF von Morbus Crohn und Morbus Crohn Stenose durchgeführt. Bei diesen war im Gegensatz zu den Tierexperimenten keine erhöhte IL-6/IL-8-

Sekretion nach CpG-ODN-Stimulation nachweisbar. Umso interessanter ist das Ergebnis, dass MC-CLPF jedoch mit einer signifikant gesteigerten IL-6/IL-8-Sekretion antworten, wenn sie mit CpG-ODN und IL-33 zusammen stimuliert werden. Weitere das Ergebnis dieser Arbeit stützende Studien fehlen bis jetzt. CpG-ODN ist in der Lage die IL-33-Expression zu induzieren [283]. Möglicherweise bewirkt die Stimulation mit CpG-ODN die Induktion von IL-33 in MC-CLPF. Dadurch kommt es zu einem Überwiegen von IL-33 gegenüber CpG-ODN und damit zu den IL-33-abhängigen Wirkungen. Interessant ist jedoch, dass dieser Effekt lediglich in MC-CLPF, aber nicht in MCS-CLPF nachweisbar ist. *SIGIRR/Tir8* ist ein Protein, das als negativer Regulator des IL-33-Rezeptors ST2 wirkt. *SIGIRR*-defiziente Mäuse weisen nach IL-33-Stimulation stärkere IL-4- und IL-5-Sekretionen auf als Mäuse ohne *SIGIRR*-Defizienz. Weiterhin zeigten *SIGIRR*-defiziente murine dendritische Zellen eine verstärkte proinflammatorische Antwort nach CpG-ODN-Stimulation und *SIGIRR*-defiziente Mäuse sind verstärkt anfällig für intestinale Inflammation, die sich in verstärkter IL-6- und TNF-Sekretion äußert [284, 285]. Spekuliert werden kann, dass MC-CLPF *SIGIRR* defizient sind und daher auf die CpG-Stimulation mit IL-6 und IL-8-Sekretion reagieren. Ergebnisse dazu stehen jedoch aus.

CpG-ODN agiert über seinen Rezeptor TLR9 und stimuliert in Makrophagen und dendritischen Zellen die Sekretion von HMGB1. HMGB1 ist ein Protein, das CpG-ODN bindet [286]. Es interagiert mit TLR9 und beschleunigt die Verteilung von TLR9 auf Endosomen nach CpG-ODN-Stimulation. Zudem erleichtert und beschleunigt HMGB1 die Bindung von CpG-ODN an seinen Rezeptor und führt zu einer verstärkten Sekretion von TNF, IL-6 und IL-12 [286]. Entsprechend führt ein Mangel an HMGB1 zu fehlender IL-6-, IL-12- und TNF-Antwort nach CpG-ODN-Stimulation. Es könnte sein, dass MC-CLPF zu wenig HMGB1 synthetisieren und dieses erst durch die Kostimulation mit IL-33 induziert und zu einer signifikanten IL-6/IL-8-Sekretion führt. Zudem wird HMGB1 überwiegend aus nekrotischen Zellen freigesetzt [287, 288]. Das wiederum könnte durch abgestorbene MC-CLPF während des Stimulationsversuchs geschehen sein und zu verstärkter Freisetzung von HMGB1 geführt haben. Dies würde erklären, dass CpG+IL-33 in MC-, aber nicht in MCS-CLPF zu einer gesteigerten IL-6/IL-8-



Sekretion führt. Weiterhin wird HMGB1 nach Exposition mit proinflammatorischen Zytokinen sowie NO aktiv sezerniert [231]. MC-CLPF sezernieren nicht nur IL-6 und IL-8 stärker als KO-CLPF sondern stehen auch im Verdacht vermehrt NO zu sezernieren. Dies könnte die Sekretion von HMGB1 verstärken und zu den gerade beschriebenen Effekten führen. Weitere Ergebnisse stehen aus.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Morbus Crohn ist eine Erkrankung für die bis zum jetzigen Zeitpunkt keine kausale Therapie bekannt ist und deren Ätiologie und Pathogenese bis heute viele Fragen aufwirft. Daher ist es von großer Bedeutung die weiteren Bestandteile, die an der Entzündung beteiligt sind zu identifizieren. In dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss von IL-33 auf primäre Colon-Lamina-propria-Fibroblasten von Patienten mit Morbus Crohn bzw. Stenose bei Morbus Crohn sowie von Kontroll-Patienten untersucht.

Erstmals konnte gezeigt werden, dass KO-, MC- und MCS-CLPF den IL-33-Rezeptor exprimieren und dementsprechend auf Stimulation mit IL-33 mit gesteigerter IL-6/IL-8-Sekretion reagieren. Mit diesem Ergebnis konnte die Hypothese, dass IL-33 als Zytokin der  $T_H2$ -assoziierten Zytokinaktivierung, wie z. B. IL-4 und IL-5 in MC- und MCS-CLPF, die IL-6/IL-8-Sekretion hemmt und als ein potenzielles Therapeutikum in Frage kommt, widerlegt werden. Größere Unterschiede im IL-6-/IL-8-Sekretionsverhalten zwischen KO-, MC- und MCS-CLPF untereinander konnten nicht festgestellt werden, außer der Gegebenheit, dass MC- und MCS-CLPF mit einer tendenziell stärkeren IL-6/IL-8-Sekretion reagieren als KO-CLPF. Dies ist wahrscheinlich auf die bereits in Ruhe verstärkte IL-6- und IL-8-Sekretion von MC- und MCS-CLPF zurückzuführen. Zudem konnte gezeigt werden, dass KO-CLPF dosisabhängig auf IL-33 reagieren, MC- und MCS-CLPF nicht. Ferner wurde demonstriert, dass CU-CLPF den IL-33-Rezeptor unter den CLPF am stärksten und MC-LPMZ unter den LPMZ-Gruppen exprimieren. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MC- und MCS-CLPF auf CpG-ODN, anders als in Tierexperimenten, nicht mit verstärkter IL-6/IL-8-Sekretion reagieren, während die Kostimulation mit CpG-ODN und IL-33 in MC-CLPF, jedoch nicht in MCS-CLPF eine signifikant gesteigerte IL-6/IL-8-Sekretion bewirkt. Schließlich konnte in den durchgeführten Untersuchungen eine verstärkte p-ERK-42/44-Aktivierung in MCS-CLPF nach Stimulation mit TNF+IL-33 und CpG+IL-33 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit durchgeführten IL-33-Stimulationen einen potenziell entzündungshemmenden Effekt von IL-33 in

MC- und MCS-CLPF widerlegen konnten, jedoch eine entzündungsfördernde Rolle von IL-33 stützen. Insgesamt mehren sich Untersuchungsergebnisse, die auf eine Beteiligung von IL-33 als proinflammatorisches Protein an der Pathogenese von chronisch entzündlichen Krankheiten hindeuten. Es bestehen Hinweise dafür, dass IL-33 im Anfangsstadium der Krankheitsentstehung von CED eine wesentliche Rolle bei der Entscheidung spielt, ob sich die Krankheit in Richtung  $T_H1$ -assoziiertem Morbus Crohn oder der  $T_H2$ -assoziierten Colitis Ulcerosa entwickelt. Zu viel IL-33 könnte zu Colitis Ulcerosa führen, wenig IL-33 zu Morbus Crohn [258]. Bereits gezeigt werden konnte, dass die IL-33-Konzentration in entzündeter Schleimhaut sowie im Serum von Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung erhöht ist. Zudem ist auch der lösliche antiinflammatorisch wirkende Rezeptor sST2 im Serum von CED-Patienten erhöht nachweisbar [258]. Ferner konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MC-LPMZ sowie CU-CLPF sehr stark ST2 exprimieren. Ebenso finden sich im Serum von Systemischem Lupus erythematodes (SLE)-Patienten erhöhte sST2-Konzentrationen. Diese korrelieren positiv mit der Krankheitsaktivität [289]. Erhöhte IL-33-Expression ist ebenfalls in synovialen Fibroblasten bei rheumatoider Arthritis nachweisbar. Dort konnte bereits in Tierexperimenten gezeigt werden, dass Anti-ST2-AK die Entzündungsaktivität von rheumatoider Arthritis erfolgreich senken [140]. Weiterhin konnten in Tierexperimenten TNF-AK die Konzentration an zirkulierendem IL-33 in der Colitis reduzieren [118, 258]. All diese Fakten sprechen dafür, dass IL-33 bzw. ST2 als neues potentiell Target einer Therapie gegen CED in Frage kommt. Untersuchungen dazu stehen noch aus.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Hoffmann, J.C., et al., *[Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease]*. Z Gastroenterol, 2008. **46**(9): p. 1094-146.
2. Loftus, E.V., Jr., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1504-17.
3. Karlinger, K., et al., *The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Eur J Radiol, 2000. **35**(3): p. 154-67.
4. Loftus, E.V., Jr. and W.J. Sandborn, *Epidemiology of inflammatory bowel disease*. Gastroenterol Clin North Am, 2002. **31**(1): p. 1-20.
5. Shivananda, S., et al., *Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD)*. Gut, 1996. **39**(5): p. 690-7.
6. Best, W.R., et al., *Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study*. Gastroenterology, 1976. **70**(3): p. 439-44.
7. Best, W.R., J.M. Beckett, and J.W. Singleton, *Rederived values of the eight coefficients of the Crohn's Disease Activity Index (CDAI)*. Gastroenterology, 1979. **77**(4 Pt 2): p. 843-6.
8. Tysk, C., et al., *Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking*. Gut, 1988. **29**(7): p. 990-6.
9. Orholm, M., et al., *Familial occurrence of inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 1991. **324**(2): p. 84-8.
10. Parrish, N.M., et al., *Absence of mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Crohn's patients*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(4): p. 558-65.
11. Hugot, J.P., et al., *Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16*. Nature, 1996. **379**(6568): p. 821-3.
12. Hugot, J.P., et al., *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 599-603.
13. Ogura, Y., et al., *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 603-6.
14. Lesage, S., et al., *CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease*. Am J Hum Genet, 2002. **70**(4): p. 845-57.
15. Franke, A., et al., *Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci*. Nat Genet. **42**(12): p. 1118-25.
16. Bridger, S., et al., *In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis*. Gut, 2002. **51**(1): p. 21-5.
17. Mirow, L., et al., *[Recurrence of Crohn's disease after surgery--causes and risks]*. Zentralbl Chir, 2008. **133**(2): p. 182-7.
18. Sutherland, L.R., et al., *Effect of cigarette smoking on recurrence of Crohn's disease*. Gastroenterology, 1990. **98**(5 Pt 1): p. 1123-8.

19. Cosnes, J., et al., *Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study*. Gastroenterology, 2001. **120**(5): p. 1093-9.
20. Reif, S., et al., *Lack of association between smoking and Crohn's disease but the usual association with ulcerative colitis in Jewish patients in Israel: a multicenter study*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(2): p. 474-8.
21. Boyko, E.J., et al., *Increased risk of inflammatory bowel disease associated with oral contraceptive use*. Am J Epidemiol, 1994. **140**(3): p. 268-78.
22. Cornish, J.A., et al., *The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis*. Am J Gastroenterol, 2008. **103**(9): p. 2394-400.
23. Andersson, R.E., et al., *Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease*. Gastroenterology, 2003. **124**(1): p. 40-6.
24. Garcia Rodriguez, L.A., et al., *Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population*. Aliment Pharmacol Ther, 2005. **22**(4): p. 309-15.
25. Shoda, R., et al., *Therapeutic efficacy of N-3 polyunsaturated fatty acid in experimental Crohn's disease*. J Gastroenterol, 1995. **30 Suppl 8**: p. 98-101.
26. Riordan, A.M., C.H. Ruxton, and J.O. Hunter, *A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars*. Eur J Clin Nutr, 1998. **52**(4): p. 229-38.
27. Reif, S., et al., *Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease*. Gut, 1997. **40**(6): p. 754-60.
28. Asakura, H., et al., *Is there a link between food and intestinal microbes and the occurrence of Crohn's disease and ulcerative colitis?* J Gastroenterol Hepatol, 2008. **23**(12): p. 1794-801.
29. Lakatos, P.L., *Environmental factors affecting inflammatory bowel disease: have we made progress?* Dig Dis, 2009. **27**(3): p. 215-25.
30. Gearry, R.B., et al., *Population-based cases control study of inflammatory bowel disease risk factors*. J Gastroenterol Hepatol. **25**(2): p. 325-33.
31. Thompson, N.P., et al., *Early determinants of inflammatory bowel disease: use of two national longitudinal birth cohorts*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2000. **12**(1): p. 25-30.
32. Thompson, N.P., et al., *Is measles vaccination a risk factor for inflammatory bowel disease?* Lancet, 1995. **345**(8957): p. 1071-4.
33. Pardi, D.S., et al., *Early measles virus infection is associated with the development of inflammatory bowel disease*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(6): p. 1480-5.
34. Montgomery, S.M., et al., *Paramyxovirus infections in childhood and subsequent inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1999. **116**(4): p. 796-803.
35. Ekbom, A., et al., *Crohn's disease after in-utero measles virus exposure*. Lancet, 1996. **348**(9026): p. 515-7.
36. Bernstein, C.N., P. Rawsthorne, and J.F. Blanchard, *Population-based case-control study of measles, mumps, and rubella and inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(6): p. 759-62.
37. Davis, R.L. and K. Bohlke, *Measles vaccination and inflammatory bowel disease: controversy laid to rest?* Drug Saf, 2001. **24**(13): p. 939-46.

38. Koutroubakis, I., et al., *Environmental risk factors in inflammatory bowel disease*. Hepatogastroenterology, 1996. **43**(8): p. 381-93.
39. Hermon-Taylor, J., *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, Crohn's disease and the Doomsday scenario*. Gut Pathog, 2009. **1**(1): p. 15.
40. Waddell, L.A., et al., *The zoonotic potential of Mycobacterium avium spp. paratuberculosis: a systematic review*. Can J Public Health, 2008. **99**(2): p. 145-55.
41. Chiodini, R.J., et al., *Characteristics of an unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease*. J Clin Microbiol, 1984. **20**(5): p. 966-71.
42. Prantera, C., et al., *Crohn's disease and mycobacteria: two cases of Crohn's disease with high anti-mycobacterial antibody levels cured by dapsone therapy*. Biomed Pharmacother, 1989. **43**(4): p. 295-9.
43. Sanderson, J.D., et al., *Mycobacterium paratuberculosis DNA in Crohn's disease tissue*. Gut, 1992. **33**(7): p. 890-6.
44. Sasikala, M., et al., *Absence of Mycobacterium avium ss paratuberculosis-specific IS900 sequence in intestinal biopsy tissues of Indian patients with Crohn's disease*. Indian J Gastroenterol, 2009. **28**(5): p. 169-74.
45. Toracchio, S., et al., *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease granulomas*. Scand J Gastroenterol, 2008. **43**(9): p. 1108-11.
46. Lozano-Leon, A., M. Barreiro-de Acosta, and J.E. Dominguez-Munoz, *Absence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Crohn's disease patients*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(12): p. 1190-2.
47. Sibartie, S., et al., *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis (MAP) as a modifying factor in Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis. **16**(2): p. 296-304.
48. Kirkwood, C.D., et al., *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in children with early-onset Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(11): p. 1643-55.
49. Pineton de Chambrun, G., et al., *Pathogenic agents in inflammatory bowel diseases*. Curr Opin Gastroenterol, 2008. **24**(4): p. 440-7.
50. Feller, M., et al., *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Infect Dis, 2007. **7**(9): p. 607-13.
51. Strober, W., I.J. Fuss, and R.S. Blumberg, *The immunology of mucosal models of inflammation*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 495-549.
52. Murata, Y., et al., *The role of proinflammatory and immunoregulatory cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis*. J Gastroenterol, 1995. **30 Suppl 8**: p. 56-60.
53. James, S.P. and J.M. Klapproth, *Major pathways of mucosal immunity and inflammation: cell activation, cytokine production and the role of bacterial factors*. Aliment Pharmacol Ther, 1996. **10 Suppl 2**: p. 1-9.
54. Cominelli, F., *Cytokine-based therapies for Crohn's disease--new paradigms*. N Engl J Med, 2004. **351**(20): p. 2045-8.
55. Xie, J. and S.H. Itzkowitz, *Cancer in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(3): p. 378-89.

56. Karolyi, Z., et al., [*Cutaneous and mucosal manifestations of inflammatory bowel diseases*]. *Orv Hetil*, 2000. **141**(25): p. 1391-5.
57. Farhi, D., et al., *Significance of erythema nodosum and pyoderma gangrenosum in inflammatory bowel diseases: a cohort study of 2402 patients*. *Medicine (Baltimore)*, 2008. **87**(5): p. 281-93.
58. Timani, S. and D.F. Mutasim, *Skin manifestations of inflammatory bowel disease*. *Clin Dermatol*, 2008. **26**(3): p. 265-73.
59. Canavan, C., K.R. Abrams, and J. Mayberry, *Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006. **23**(8): p. 1097-104.
60. Bernstein, C.N., et al., *Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study*. *Cancer*, 2001. **91**(4): p. 854-62.
61. Papadakis, K.A., et al., *Anti-flagellin (CBir1) phenotypic and genetic Crohn's disease associations*. *Inflamm Bowel Dis*, 2007. **13**(5): p. 524-30.
62. Targan, S.R., et al., *Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 2005. **128**(7): p. 2020-8.
63. Feagan, B.G., et al., *Methotrexate for the treatment of Crohn's disease. The North American Crohn's Study Group Investigators*. *N Engl J Med*, 1995. **332**(5): p. 292-7.
64. Hommes, D.W., et al., *Infliximab treatment for Crohn's disease: one-year experience in a Dutch academic hospital*. *Inflamm Bowel Dis*, 2002. **8**(2): p. 81-6.
65. Panaccione, R., *Infliximab for the treatment of Crohn's disease: review and indications for clinical use in Canada*. *Can J Gastroenterol*, 2001. **15**(6): p. 371-5.
66. Herfarth, H., et al., *Improvement of arthritis and arthralgia after treatment with infliximab (Remicade) in a German prospective, open-label, multicenter trial in refractory Crohn's disease*. *Am J Gastroenterol*, 2002. **97**(10): p. 2688-90.
67. Colombel, J.F., et al., *The safety profile of infliximab in patients with Crohn's disease: the Mayo clinic experience in 500 patients*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(1): p. 19-31.
68. Rosh, J.R., et al., *Hepatosplenic T-cell lymphoma in adolescents and young adults with Crohn's disease: a cautionary tale?* *Inflamm Bowel Dis*, 2007. **13**(8): p. 1024-30.
69. Drini, M., et al., *Hepatosplenic T-cell lymphoma following infliximab therapy for Crohn's disease*. *Med J Aust*, 2008. **189**(8): p. 464-5.
70. Patkar, N.M., et al., *Association of infections and tuberculosis with antitumor necrosis factor alpha therapy*. *Curr Opin Rheumatol*, 2008. **20**(3): p. 320-6.
71. Curtis, J.R., et al., *Risk of serious bacterial infections among rheumatoid arthritis patients exposed to tumor necrosis factor alpha antagonists*. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(4): p. 1125-33.
72. Keane, J., et al., *Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(15): p. 1098-104.

73. Heuschkel, R.B., et al., *Enteral nutrition and corticosteroids in the treatment of acute Crohn's disease in children*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2000. **31**(1): p. 8-15.
74. Beattie, R.M., B.S. Bentsen, and T.T. MacDonald, *Childhood Crohn's disease and the efficacy of enteral diets*. Nutrition, 1998. **14**(4): p. 345-50.
75. Thia, K.T., et al., *Ciprofloxacin or metronidazole for the treatment of perianal fistulas in patients with Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(1): p. 17-24.
76. Sandborn, W.J. and B.G. Feagan, *Review article: mild to moderate Crohn's disease--defining the basis for a new treatment algorithm*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. **18**(3): p. 263-77.
77. Steinhart, A.H., et al., *Combined budesonide and antibiotic therapy for active Crohn's disease: a randomized controlled trial*. Gastroenterology, 2002. **123**(1): p. 33-40.
78. Jakobovits, J. and M.M. Schuster, *Metronidazole therapy for Crohn's disease and associated fistulae*. Am J Gastroenterol, 1984. **79**(7): p. 533-40.
79. Murray, J., et al., *Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro*. Blood, 1997. **90**(7): p. 2772-83.
80. Tracey, K.J. and A. Cerami, *Tumor necrosis factor: an updated review of its biology*. Crit Care Med, 1993. **21**(10 Suppl): p. S415-22.
81. Rahman, M.M. and G. McFadden, *Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens*. PLoS Pathog, 2006. **2**(2): p. e4.
82. Tracey, K.J. and A. Cerami, *Tumor necrosis factor in metabolism of disease: hormonal actions versus local tissue effects*. Nouv Rev Fr Hematol, 1992. **34 Suppl**: p. S37-42.
83. Plevy, S.E., et al., *A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease*. J Immunol, 1997. **159**(12): p. 6276-82.
84. Gauldie, J., et al., *IFN beta 2/BSF2/IL-6 is the monocyte-derived HSF that regulates receptor-specific acute phase gene regulation in hepatocytes*. Ann N Y Acad Sci, 1989. **557**: p. 46-58; discussion 58-9.
85. Van Snick, J., *Interleukin-6: an overview*. Annu Rev Immunol, 1990. **8**: p. 253-78.
86. Gross, V., et al., *Inflammatory mediators in chronic inflammatory bowel diseases*. Klin Wochenschr, 1991. **69**(21-23): p. 981-7.
87. Jones, S.A., *Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6*. J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3463-8.
88. Ito, H., *IL-6 and Crohn's disease*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2003. **2**(2): p. 125-30.
89. Kishimoto, T. and T. Hirano, *Molecular regulation of B lymphocyte response*. Annu Rev Immunol, 1988. **6**: p. 485-512.
90. Straub, R.H., et al., *Uncoupling of the sympathetic nervous system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in inflammatory bowel disease? J Neuroimmunol*, 2002. **126**(1-2): p. 116-25.



91. Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis, *Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine*. FEBS Lett, 1992. **307**(1): p. 97-101.
92. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines*. Adv Immunol, 1994. **55**: p. 97-179.
93. Lindley, I., et al., *Synthesis and expression in Escherichia coli of the gene encoding monocyte-derived neutrophil-activating factor: biological equivalence between natural and recombinant neutrophil-activating factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(23): p. 9199-203.
94. Clore, G.M. and A.M. Gronenborn, *NMR and X-ray analysis of the three-dimensional structure of interleukin-8*. Cytokines, 1992. **4**: p. 18-40.
95. Leonard, E.J., et al., *Neutrophil recruitment by intradermally injected neutrophil attractant/activation protein-1*. J Invest Dermatol, 1991. **96**(5): p. 690-4.
96. Oppenheim, J.J., et al., *Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 617-48.
97. Li, A., et al., *IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3369-76.
98. Krieger, M., et al., *Activation of human basophils through the IL-8 receptor*. J Immunol, 1992. **149**(8): p. 2662-7.
99. Taub, D.D., et al., *Chemotaxis of T lymphocytes on extracellular matrix proteins. Analysis of the in vitro method to quantitate chemotaxis of human T cells*. J Immunol Methods, 1995. **184**(2): p. 187-98.
100. Strader, C.D., I.S. Sigal, and R.A. Dixon, *Genetic approaches to the determination of structure-function relationships of G protein-coupled receptors*. Trends Pharmacol Sci, 1989. **Suppl**: p. 26-30.
101. Holmes, W.E., et al., *Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor*. Science, 1991. **253**(5025): p. 1278-80.
102. Apostolakis, S., et al., *Erythrocyte Duffy antigen receptor for chemokines (DARC): diagnostic and therapeutic implications in atherosclerotic cardiovascular disease*. Acta Pharmacol Sin. **32**(4): p. 417-24.
103. Neote, K., et al., *Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor*. Blood, 1994. **84**(1): p. 44-52.
104. Carre, P.C., et al., *Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis*. J Clin Invest, 1991. **88**(6): p. 1802-10.
105. Miller, E.J., et al., *Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality*. Am Rev Respir Dis, 1992. **146**(2): p. 427-32.
106. Marini, M., et al., *Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1992. **89**(5): p. 1001-9.

107. Nakamura, H., et al., *Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line*. J Clin Invest, 1992. **89**(5): p. 1478-84.
108. Schmitz, J., et al., *IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines*. Immunity, 2005. **23**(5): p. 479-90.
109. Barksby, H.E., et al., *The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders*. Clin Exp Immunol, 2007. **149**(2): p. 217-25.
110. Dinarello, C.A., *The IL-1 family and inflammatory diseases*. Clin Exp Rheumatol, 2002. **20**(5 Suppl 27): p. S1-13.
111. Miller, A.M., et al., *IL-33 reduces the development of atherosclerosis*. J Exp Med, 2008. **205**(2): p. 339-46.
112. Komai-Koma, M., et al., *IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(10): p. 2779-86.
113. Trajkovic, V., M.J. Sweet, and D. Xu, *T1/ST2--an IL-1 receptor-like modulator of immune responses*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(2-3): p. 87-95.
114. Smithgall, M.D., et al., *IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells*. Int Immunol, 2008. **20**(8): p. 1019-30.
115. Allakhverdi, Z., et al., *Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells*. J Immunol, 2007. **179**(4): p. 2051-4.
116. Demyanets, S., et al., *Interleukin-33 induces expression of adhesion molecules and inflammatory activation in human endothelial cells and in human atherosclerotic plaques*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. **31**(9): p. 2080-9.
117. Chow, J.Y., et al., *Intracellular signaling mechanisms regulating the activation of human eosinophils by the novel Th2 cytokine IL-33: implications for allergic inflammation*. Cell Mol Immunol. **7**(1): p. 26-34.
118. Verri, W.A., Jr., et al., *IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy*. Ann Rheum Dis. **69**(9): p. 1697-703.
119. Alves-Filho, J.C., et al., *Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection*. Nat Med. **16**(6): p. 708-12.
120. Oboki, K., et al., *IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A. **107**(43): p. 18581-6.
121. Pecaric-Petkovic, T., et al., *Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33*. Blood, 2009. **113**(7): p. 1526-34.
122. Rank, M.A., et al., *IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(5): p. 1047-54.
123. Besnard, A.G., et al., *IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation*. Eur J Immunol. **41**(6): p. 1675-86.
124. Coyle, A.J., et al., *Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses*. J Exp Med, 1999. **190**(7): p. 895-902.

125. Xu, D., et al., *Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells*. J Exp Med, 1998. **187**(5): p. 787-94.
126. Locksley, R.M., *Asthma and allergic inflammation*. Cell. **140**(6): p. 777-83.
127. Coffman, R.L., *Immunology. The origin of TH2 responses*. Science. **328**(5982): p. 1116-7.
128. Paul, W.E. and J. Zhu, *How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified?* Nat Rev Immunol. **10**(4): p. 225-35.
129. Neill, D.R., et al., *Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity*. Nature. **464**(7293): p. 1367-70.
130. Moro, K., et al., *Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells*. Nature. **463**(7280): p. 540-4.
131. Saenz, S.A., B.C. Taylor, and D. Artis, *Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites*. Immunol Rev, 2008. **226**: p. 172-90.
132. Wood, I.S., B. Wang, and P. Trayhurn, *IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **384**(1): p. 105-9.
133. Hudson, C.A., et al., *Induction of IL-33 expression and activity in central nervous system glia*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(3): p. 631-43.
134. Kakkar, R. and R.T. Lee, *The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(10): p. 827-40.
135. Carriere, V., et al., *IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(1): p. 282-7.
136. Lohning, M., et al., *T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6930-5.
137. Hayakawa, H., et al., *Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation*. J Biol Chem, 2007. **282**(36): p. 26369-80.
138. Tago, K., et al., *Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **285**(5): p. 1377-83.
139. Talabot-Ayer, D., et al., *Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage*. J Biol Chem, 2009. **284**(29): p. 19420-6.
140. Palmer, G., et al., *Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(3): p. 738-49.
141. Prefontaine, D., et al., *Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells*. J Immunol, 2009. **183**(8): p. 5094-103.
142. Kuchler, A.M., et al., *Nuclear interleukin-33 is generally expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation*. Am J Pathol, 2008. **173**(4): p. 1229-42.
143. Haraldsen, G., et al., *Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin?* Trends Immunol, 2009. **30**(5): p. 227-33.
144. Weinberg, E.O., et al., *Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction*. Circulation, 2002. **106**(23): p. 2961-6.

145. Dinarello, C.A., *An IL-1 family member requires caspase-1 processing and signals through the ST2 receptor*. Immunity, 2005. **23**(5): p. 461-2.
146. Seidelin, J.B., et al., *IL-33 is upregulated in colonocytes of ulcerative colitis*. Immunol Lett. **128**(1): p. 80-5.
147. Sponheim, J., et al., *Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is preferentially expressed in ulceration-associated myofibroblasts*. Am J Pathol. **177**(6): p. 2804-15.
148. Januzzi, J.L., Jr., et al., *Measurement of the interleukin family member ST2 in patients with acute dyspnea: results from the PRIDE (Pro-Brain Natriuretic Peptide Investigation of Dyspnea in the Emergency Department) study*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(7): p. 607-13.
149. Oshikawa, K., et al., *Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(2): p. 277-81.
150. Bhardwaj, A. and J.L. Januzzi, Jr., *ST2: a novel biomarker for heart failure*. Expert Rev Mol Diagn. **10**(4): p. 459-64.
151. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
152. Martin, M.U. and H. Wesche, *Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(3): p. 265-80.
153. Akira, S., *Toll receptor families: structure and function*. Semin Immunol, 2004. **16**(1): p. 1-2.
154. Hacker, H., *Signal transduction pathways activated by CpG-DNA*. Curr Top Microbiol Immunol, 2000. **247**: p. 77-92.
155. Uematsu, S. and S. Akira, *Toll-like receptors and Type I interferons*. J Biol Chem, 2007. **282**(21): p. 15319-23.
156. Chen, H.C., et al., *Effects of particle size on toll-like receptor 9-mediated cytokine profiles*. Biomaterials. **32**(6): p. 1731-7.
157. Kerkmann, M., et al., *Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 8086-93.
158. Krug, A., et al., *Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(7): p. 2154-63.
159. Marshall, J.D., et al., *Novel chimeric immunomodulatory compounds containing short CpG oligodeoxyribonucleotides have differential activities in human cells*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(17): p. 5122-33.
160. Marshall, J.D., et al., *Superior activity of the type C class of ISS in vitro and in vivo across multiple species*. DNA Cell Biol, 2005. **24**(2): p. 63-72.
161. Herskowitz, I., *MAP kinase pathways in yeast: for mating and more*. Cell, 1995. **80**(2): p. 187-97.
162. Ludwig, S., et al., *3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(12): p. 6687-97.
163. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines*. Bioessays, 1996. **18**(7): p. 567-77.

164. Sen, R. and D. Baltimore, *Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism*. Cell, 1986. **47**(6): p. 921-8.
165. Thompson, J.E., et al., *I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B*. Cell, 1995. **80**(4): p. 573-82.
166. Whiteside, S.T., et al., *I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity*. Embo J, 1997. **16**(6): p. 1413-26.
167. Kawakami, K., C. Scheidereit, and R.G. Roeder, *Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(13): p. 4700-4.
168. Baeuerle, P.A. and D. Baltimore, *I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor*. Science, 1988. **242**(4878): p. 540-6.
169. Baeuerle, P.A. and D. Baltimore, *A 65-kappaD subunit of active NF-kappaB is required for inhibition of NF-kappaB by I kappaB*. Genes Dev, 1989. **3**(11): p. 1689-98.
170. Baeuerle, P.A. and T. Henkel, *Function and activation of NF-kappa B in the immune system*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 141-79.
171. Lund, P.K. and C.C. Zuniga, *Intestinal fibrosis in human and experimental inflammatory bowel disease*. Curr Opin Gastroenterol, 2001. **17**(4): p. 318-23.
172. Yagi, Y., et al., *Inflammatory responses induced by interleukin-17 family members in human colonic subepithelial myofibroblasts*. J Gastroenterol, 2007. **42**(9): p. 746-53.
173. Yagi, Y., et al., *Interleukin-31 stimulates production of inflammatory mediators from human colonic subepithelial myofibroblasts*. Int J Mol Med, 2007. **19**(6): p. 941-6.
174. Pang, G., et al., *GM-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 alpha and TNF-alpha*. Clin Exp Immunol, 1994. **96**(3): p. 437-43.
175. Fiocchi, C., et al., *Alterations of mesenchymal and endothelial cells in inflammatory bowel diseases*. Adv Exp Med Biol, 2006. **579**: p. 168-76.
176. Newberry, R.D., et al., *Spontaneous and continuous cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 production by stromal cells in the murine small intestine lamina propria: directing the tone of the intestinal immune response*. J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4465-72.
177. Darby, I.A. and T.D. Hewitson, *Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis*. Int Rev Cytol, 2007. **257**: p. 143-79.
178. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(5): p. 349-63.
179. Badid, C., et al., *Role of myofibroblasts during normal tissue repair and excessive scarring: interest of their assessment in nephropathies*. Histol Histopathol, 2000. **15**(1): p. 269-80.
180. Desmouliere, A. and G. Gabbiani, *Myofibroblast differentiation during fibrosis*. Exp Nephrol, 1995. **3**(2): p. 134-9.

181. Andoh, A., et al., *Role of intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammation and regenerative response in the gut*. Pharmacol Ther, 2007. **114**(1): p. 94-106.
182. Pucilowska, J.B., K.L. Williams, and P.K. Lund, *Fibrogenesis. IV. Fibrosis and inflammatory bowel disease: cellular mediators and animal models*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279**(4): p. G653-9.
183. Rieder, F. and C. Fiocchi, *Intestinal fibrosis in IBD--a dynamic, multifactorial process*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2009. **6**(4): p. 228-35.
184. Leeb, S.N., et al., *Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase*. Gastroenterology, 2003. **125**(5): p. 1341-54.
185. Leeb, S.N., et al., *Regulation of migration of human colonic myofibroblasts*. Growth Factors, 2002. **20**(2): p. 81-91.
186. Lawrance, I.C., L. Maxwell, and W. Doe, *Altered response of intestinal mucosal fibroblasts to profibrogenic cytokines in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2001. **7**(3): p. 226-36.
187. Xu, X., et al., *Mast cells and eosinophils have a potential profibrogenic role in Crohn disease*. Scand J Gastroenterol, 2004. **39**(5): p. 440-7.
188. Babyatsky, M.W., G. Rossiter, and D.K. Podolsky, *Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1996. **110**(4): p. 975-84.
189. Pucilowska, J.B., et al., *IGF-I and procollagen alpha1(I) are coexpressed in a subset of mesenchymal cells in active Crohn's disease*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279**(6): p. G1307-22.
190. Zimmermann, E.M., et al., *IGF-I induces collagen and IGFBP-5 mRNA in rat intestinal smooth muscle*. Am J Physiol, 1997. **273**(4 Pt 1): p. G875-82.
191. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
192. Otte, J.M., I.M. Rosenberg, and D.K. Podolsky, *Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine*. Gastroenterology, 2003. **124**(7): p. 1866-78.
193. Brenmoehl, J., et al., *Transforming growth factor-beta 1 induces intestinal myofibroblast differentiation and modulates their migration*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(12): p. 1431-42.
194. Eda, H., et al., *Proinflammatory cytokines, IL-1beta and TNF-alpha, induce expression of interleukin-34 mRNA via JNK- and p44/42 MAPK-NF-kappaB pathway but not p38 pathway in osteoblasts*. Rheumatol Int.
195. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
196. Li, Q. and I.M. Verma, *NF-kappaB regulation in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 725-34.
197. Chakravorty, D. and K.S. Kumar, *Interaction of lipopolysaccharide with human small intestinal lamina propria fibroblasts favors neutrophil migration and peripheral blood mononuclear cell adhesion by the production of proinflammatory mediators and adhesion molecules*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1453**(2): p. 261-72.

198. Agarwal, S., et al., *Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1 beta*. J Periodontal Res, 1995. **30**(6): p. 382-9.
199. Krieg, A.M., *CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus?* J Clin Immunol, 1995. **15**(6): p. 284-92.
200. Gantner, F., et al., *CD40-dependent and -independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides*. Eur J Immunol, 2003. **33**(6): p. 1576-85.
201. Van Damme, J., et al., *Simultaneous production of interleukin 6, interferon-beta and colony-stimulating activity by fibroblasts after viral and bacterial infection*. Eur J Immunol, 1989. **19**(1): p. 163-8.
202. Helfgott, D.C., et al., *Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of beta 2 interferon by human fibroblasts*. J Exp Med, 1987. **166**(5): p. 1300-9.
203. Okuno, T., et al., *Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha induce chemokine and matrix metalloproteinase gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts*. Scand J Gastroenterol, 2002. **37**(3): p. 317-24.
204. Rogler, G., et al., *Differential activation of cytokine secretion in primary human colonic fibroblast/myofibroblast cultures*. Scand J Gastroenterol, 2001. **36**(4): p. 389-98.
205. Ng, S.B., Y.H. Tan, and G.R. Guy, *Differential induction of the interleukin-6 gene by tumor necrosis factor and interleukin-1*. J Biol Chem, 1994. **269**(29): p. 19021-7.
206. MacDermott, R.P., *Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease*. J Gastroenterol, 1996. **31**(6): p. 907-16.
207. Rogler, G., et al., *Cytokine profiles secreted by activated human colonic myofibroblasts*. Gastroenterology, 1998. **114**, **Supplement 1**(0): p. A1070.
208. Brimnes, J., et al., *Enteric bacterial antigens activate CD4(+) T cells from scid mice with inflammatory bowel disease*. Eur J Immunol, 2001. **31**(1): p. 23-31.
209. Madsen, K.L., et al., *Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora*. Inflamm Bowel Dis, 1999. **5**(4): p. 262-70.
210. Beagley, K.W. and C.O. Elson, *Cells and cytokines in mucosal immunity and inflammation*. Gastroenterol Clin North Am, 1992. **21**(2): p. 347-66.
211. Grimm, M.C., et al., *Interleukin 8: cells of origin in inflammatory bowel disease*. Gut, 1996. **38**(1): p. 90-8.
212. Ina, K., et al., *Mucosal interleukin-8 is involved in neutrophil migration and binding to extracellular matrix in inflammatory bowel disease*. Am J Gastroenterol, 1997. **92**(8): p. 1342-6.
213. McClane, S.J. and J.L. Rombeau, *Cytokines and inflammatory bowel disease: a review*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1999. **23**(5 Suppl): p. S20-4.
214. Reimund, J.M., et al., *Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease*. J Clin Immunol, 1996. **16**(3): p. 144-50.

215. De, L.K.T., C.V. Whiting, and P.W. Bland, *Proinflammatory cytokine synthesis by mucosal fibroblasts from mouse colitis is enhanced by interferon-gamma-mediated up-regulation of CD40 signalling*. Clin Exp Immunol, 2007. **147**(2): p. 313-23.
216. Chiu, Y.C., et al., *Peptidoglycan enhances IL-6 production in human synovial fibroblasts via TLR2 receptor, focal adhesion kinase, Akt, and AP-1- dependent pathway*. J Immunol, 2009. **183**(4): p. 2785-92.
217. Gelbmann, C.M., et al., *Inducible CD40 expression mediates NFkappaB activation and cytokine secretion in human colonic fibroblasts*. Gut, 2003. **52**(10): p. 1448-56.
218. Andoh, A., et al., *Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts*. Gastroenterology, 2005. **129**(3): p. 969-84.
219. Andus, T., et al., *Activation of monocytes during inflammatory bowel disease*. Pathobiology, 1991. **59**(3): p. 166-70.
220. Reinecker, H.C., et al., *Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease*. Clin Exp Immunol, 1993. **94**(1): p. 174-81.
221. Canto, E., et al., *TNF alpha production to TLR2 ligands in active IBD patients*. Clin Immunol, 2006. **119**(2): p. 156-65.
222. Fries, K.M., M.E. Felch, and R.P. Phipps, *Interleukin-6 is an autocrine growth factor for murine lung fibroblast subsets*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1994. **11**(5): p. 552-60.
223. Medvedev, A.E., et al., *Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 2257-67.
224. Yoshimura, A., T. Naka, and M. Kubo, *SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 454-65.
225. Nakagawa, R., et al., *SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses*. Immunity, 2002. **17**(5): p. 677-87.
226. Gingras, S., et al., *Re-examination of the role of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) in the regulation of toll-like receptor signaling*. J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54702-7.
227. Chinen, T., et al., *Suppressor of cytokine signaling-1 regulates inflammatory bowel disease in which both IFNgamma and IL-4 are involved*. Gastroenterology, 2006. **130**(2): p. 373-88.
228. Brint, E.K., et al., *ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance*. Nat Immunol, 2004. **5**(4): p. 373-9.
229. Shnyra, A., et al., *Reprogramming of lipopolysaccharide-primed macrophages is controlled by a counterbalanced production of IL-10 and IL-12*. J Immunol, 1998. **160**(8): p. 3729-36.
230. Espinassous, Q., et al., *IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrophages by regulating lipopolysaccharide receptor complex*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 1446-55.



231. Pisetsky, D.S., H. Erlandsson-Harris, and U. Andersson, *High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease*. Arthritis Res Ther, 2008. **10**(3): p. 209.
232. Meneghin, A., et al., *TLR9 is expressed in idiopathic interstitial pneumonia and its activation promotes in vitro myofibroblast differentiation*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(5): p. 979-92.
233. Chockalingam, A., et al., *Cutting Edge: A TLR9 Cytoplasmic Tyrosine Motif Is Selectively Required for Proinflammatory Cytokine Production*. J Immunol. **188**(2): p. 527-30.
234. Obermeier, F., et al., *CpG motifs of bacterial DNA exacerbate colitis of dextran sulfate sodium-treated mice*. Eur J Immunol, 2002. **32**(7): p. 2084-92.
235. Obermeier, F., et al., *Contrasting activity of cytosin-guanosin dinucleotide oligonucleotides in mice with experimental colitis*. Clin Exp Immunol, 2003. **134**(2): p. 217-24.
236. Bleich, A., et al., *CpG motifs of bacterial DNA exert protective effects in mouse models of IBD by antigen-independent tolerance induction*. Gastroenterology, 2009. **136**(1): p. 278-87.
237. Rachmilewitz, D., et al., *Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis*. Gastroenterology, 2002. **122**(5): p. 1428-41.
238. Kyburz, D., et al., *Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides activate synovial fibroblasts by toll-like receptor signaling*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(3): p. 642-50.
239. Yeo, S.J., et al., *CpG DNA induces self and cross-hyporesponsiveness of RAW264.7 cells in response to CpG DNA and lipopolysaccharide: alterations in IL-1 receptor-associated kinase expression*. J Immunol, 2003. **170**(2): p. 1052-61.
240. Chuang, T.H. and R.J. Ulevitch, *Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2004. **5**(5): p. 495-502.
241. Buttgereit, F., et al., *[Mechanisms of action of high-dosage glucocorticoid therapy]*. Dtsch Med Wochenschr, 1996. **121**(8): p. 248-52.
242. Tobler, A., et al., *Glucocorticoids downregulate gene expression of GM-CSF, NAP-1/IL-8, and IL-6, but not of M-CSF in human fibroblasts*. Blood, 1992. **79**(1): p. 45-51.
243. Zitnik, R.J., N.L. Whiting, and J.A. Elias, *Glucocorticoid inhibition of interleukin-1-induced interleukin-6 production by human lung fibroblasts: evidence for transcriptional and post-transcriptional regulatory mechanisms*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1994. **10**(6): p. 643-50.
244. Oddera, S., et al., *Effects of triamcinolone acetonide on adult human lung fibroblasts: decrease in proliferation, surface molecule expression and mediator release*. Int Arch Allergy Immunol, 2002. **129**(2): p. 152-9.
245. Bruin, K.F., et al., *Modulation of cytokine release from human monocytes by drugs used in the therapy of inflammatory bowel diseases*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1995. **7**(8): p. 791-5.
246. Naiki, Y., et al., *Transforming growth factor-beta differentially inhibits MyD88-dependent, but not TRAM- and TRIF-dependent,*

- lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5491-5.
247. Zhu, J. and W. Carver, *Effects of interleukin-33 on cardiac fibroblast gene expression and activity*. Cytokine. **58**(3): p. 368-79.
248. Klemenz, R., S. Hoffmann, and A.K. Werenskiold, *Serum- and oncoprotein-mediated induction of a gene with sequence similarity to the gene encoding carcinoembryonic antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(15): p. 5708-12.
249. Tominaga, S., *A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor*. FEBS Lett, 1989. **258**(2): p. 301-4.
250. Kurokawa, M., et al., *Expression and effects of IL-33 and ST2 in allergic bronchial asthma: IL-33 induces eotaxin production in lung fibroblasts*. Int Arch Allergy Immunol. **155 Suppl 1**: p. 12-20.
251. Gachter, T., A.K. Werenskiold, and R. Klemenz, *Transcription of the interleukin-1 receptor-related T1 gene is initiated at different promoters in mast cells and fibroblasts*. J Biol Chem, 1996. **271**(1): p. 124-9.
252. Seidelin, J.B., G. Rogler, and O.H. Nielsen, *A role for interleukin-33 in T(H)2-polarized intestinal inflammation?* Mucosal Immunol. **4**(5): p. 496-502.
253. Manetti, M., et al., *The IL1-like cytokine IL33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis. **69**(3): p. 598-605.
254. Tajima, S., et al., *ST2 gene induced by type 2 helper T cell (Th2) and proinflammatory cytokine stimuli may modulate lung injury and fibrosis*. Exp Lung Res, 2007. **33**(2): p. 81-97.
255. Kumar, S., et al., *Expression of ST2, an interleukin-1 receptor homologue, is induced by proinflammatory stimuli*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **235**(3): p. 474-8.
256. Huang, X., et al., *ST2 is essential for Th2 responsiveness and resistance to pseudomonas aeruginosa keratitis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(10): p. 4626-33.
257. Beltran, C.J., et al., *Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis. **16**(7): p. 1097-107.
258. Pastorelli, L., et al., *Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis*. Proc Natl Acad Sci U S A. **107**(17): p. 8017-22.
259. Liew, F.Y., N.I. Pitman, and I.B. McInnes, *Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family*. Nat Rev Immunol. **10**(2): p. 103-10.
260. Pushparaj, P.N., et al., *The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9773-8.
261. Sanada, S., et al., *IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system*. J Clin Invest, 2007. **117**(6): p. 1538-49.
262. Diaz-Jimenez, D., et al., *Soluble ST2: a new and promising activity marker in ulcerative colitis*. World J Gastroenterol. **17**(17): p. 2181-90.

263. Wong, C.K., et al., *Activation of eosinophils interacting with dermal fibroblasts by pruritogenic cytokine IL-31 and alarmin IL-33: implications in atopic dermatitis*. PLoS One. **7**(1): p. e29815.
264. Xu, D., et al., *IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(31): p. 10913-8.
265. Moulin, D., et al., *Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells*. Cytokine, 2007. **40**(3): p. 216-25.
266. Palmer, G., et al., *The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33*. Cytokine, 2008. **42**(3): p. 358-64.
267. Ho, L.H., et al., *IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-FcepsilonRI signals*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(6): p. 1481-90.
268. Yasuoka, S., et al., *Production and functions of IL-33 in the central nervous system*. Brain Res. **1385**: p. 8-17.
269. Waetzig, G.H., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease*. J Immunol, 2002. **168**(10): p. 5342-51.
270. Dahan, S., et al., *Epithelial: lamina propria lymphocyte interactions promote epithelial cell differentiation*. Gastroenterology, 2008. **134**(1): p. 192-203.
271. Docena, G., et al., *Down-regulation of p38 mitogen-activated protein kinase activation and proinflammatory cytokine production by mitogen-activated protein kinase inhibitors in inflammatory bowel disease*. Clin Exp Immunol. **162**(1): p. 108-15.
272. Funakoshi-Tago, M., et al., *TRAF6 is a critical signal transducer in IL-33 signaling pathway*. Cell Signal, 2008. **20**(9): p. 1679-86.
273. Boone, D.L., et al., *The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 1052-60.
274. Lee, E.G., et al., *Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice*. Science, 2000. **289**(5488): p. 2350-4.
275. Opipari, A.W., Jr., M.S. Boguski, and V.M. Dixit, *The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein*. J Biol Chem, 1990. **265**(25): p. 14705-8.
276. Song, H.Y., M. Rothe, and D.V. Goeddel, *The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6721-5.
277. Gonzalez-Leon, M.C., et al., *Nitric oxide induces SOCS-1 expression in human monocytes in a TNF-alpha-dependent manner*. J Endotoxin Res, 2006. **12**(5): p. 296-306.
278. Grisham, M.B., *Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease*. Lancet, 1994. **344**(8926): p. 859-61.
279. Bauerova, K. and A. Bezek, *Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis*. Gen Physiol Biophys, 1999. **18 Spec No**: p. 15-20.
280. Babbs, C.F., *Oxygen radicals in ulcerative colitis*. Free Radic Biol Med, 1992. **13**(2): p. 169-81.

- 281. Frobose, H., et al., *Suppressor of cytokine Signaling-3 inhibits interleukin-1 signaling by targeting the TRAF-6/TAK1 complex*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(7): p. 1587-96.
- 282. Emanuelli, B., et al., *SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice*. J Biol Chem, 2001. **276**(51): p. 47944-9.
- 283. Shimosato, T., et al., *CpG oligodeoxynucleotides induce strong up-regulation of interleukin 33 via Toll-like receptor 9*. Biochem Biophys Res Commun. **394**(1): p. 81-6.
- 284. Garlanda, C., et al., *Intestinal inflammation in mice deficient in Tir8, an inhibitory member of the IL-1 receptor family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3522-6.
- 285. Xiao, H., et al., *The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis*. Immunity, 2007. **26**(4): p. 461-75.
- 286. Ivanov, S., et al., *A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA*. Blood, 2007. **110**(6): p. 1970-81.
- 287. Scaffidi, P., T. Misteli, and M.E. Bianchi, *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 191-5.
- 288. Campana, L., L. Bosurgi, and P. Rovere-Querini, *HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(5): p. 518-23.
- 289. Mok, M.Y., et al., *Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus*. Rheumatology (Oxford). **49**(3): p. 520-7.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktivierung von ruhenden T-Zellen (in Anlehnung an Van Snick [85]) .....	13
Abbildung 2: IL-6/IL-1-Antwort auf unbestimmten externen Reiz (in Anlehnung an Van Snick [85]).....	16
Abbildung 3: Signaltransduktion von IL-33 ( in Anlehnung an Kakkar R. [134]) .....	21
Abbildung 4: KO-CLPF in Kultur.....	38
Abbildung 5: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der KO-, MC-, MCS-CLPF mit TNF .....	51
Abbildung 6: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der KO-, MC, MCS-CLPF mit TNF .....	52
Abbildung 7: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der KO-, MC-, MCS-CLPF mit LPS.....	53
Abbildung 8: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der KO-, MC-, MCS-CLPF mit LPS.....	54
Abbildung 9: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der KO-, MC-, MCS-CLPF mit CpG-ODN .....	55
Abbildung 10: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der KO-, MC-, MCS-CLPF mit CpG-ODN.....	56
Abbildung 11: Nachweis von ST2/IL-1 R4 auf Gesamtbiospien von CU-Patienten .....	58
Abbildung 12: Nachweis von ST2/IL-1 R4 auf Gesamtbiospien von KO- und MC-Patienten .....	59
Abbildung 13: Nachweis von ST2/IL-1 R4 auf unstimulierten KO-, MC-, CU- und MCF-CLPF .....	59
Abbildung 14: Nachweis von ST2/IL-1 R4 auf unstimulierten KO-, MC- und CU-LPMZ .....	60
Abbildung 15: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF mit steigenden Dosen von IL-33 .....	61

Abbildung 16: Interleukin-8 Antwort bei Stimulation der KO-CLPF mit steigenden Dosen von IL-33 .....	62
Abbildung 17: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der MC-CLPF mit steigenden Dosen von IL-33 .....	63
Abbildung 18: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der MC-CLPF mit steigenden Dosen von IL-33 .....	64
Abbildung 19: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der MCS-CLPF mit steigenden Dosen von IL 33.....	65
Abbildung 20: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der MCS-CLPF mit steigenden Dosen von IL-33 .....	66
Abbildung 21: Zusammenfassung der Interleukin-6-Antwort bei Stimulation von KO-, MC- und MCS-CLPF mit steigenden Dosen von IL-33 .....	67
Abbildung 22: Zusammenfassung der Interleukin-8-Antwort bei Stimulation von KO-, MC- und MCS-CLPF mit steigenden Dosen von IL-33 .....	68
Abbildung 23: Einfluss von LPS, TNF, CpG-ODN und IL-33 auf die Aktivierung und Phosphorylierung von p-ERK 42/44 bei KO-CLPF nach 48 h .....	71
Abbildung 24: Einfluss von LPS, TNF, CpG-ODN und IL-33 auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B p65 bei KO-CLPF nach 48 h .....	72
Abbildung 25: Einfluss von LPS, TNF, CpG-ODN und IL-33 auf die Expression und Phosphorylierung von p-ERK 42/44 bei MCS-CLPF nach 48 h .....	73
Abbildung 26: Einfluss von LPS, TNF, CpG-ODN und IL-33 auf die Aktivierung und Phosphorylierung von NF- $\kappa$ B p65 bei MCS-CLPF nach 48 h .....	74
Abbildung 27: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF mit TNF, TNF+IL-33 .....	76
Abbildung 28: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF mit TNF, TNF+IL-33 .....	77

Abbildung 29: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF, MC-CLPF, MCS-CLPF mit LPS, LPS+IL-33 .....	78
Abbildung 30: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF, MC-CLPF, MCS-CLPF mit LPS, LPS+IL-33 .....	79
Abbildung 31: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF, MC-CLPF, MCS-CLPF mit CpG ODN, CpG-ODN+IL-33.....	80
Abbildung 32: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF, MC-CLPF, MCS-CLPF mit CpG ODN, CpG-ODN+IL-33.....	81
Abbildung 33: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF mit LPS und LPS plus steigender Konzentration von IL-33.....	83
Abbildung 34: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der KO-CLPF mit LPS und LPS plus steigende Konzentrationen von IL-33 .....	84
Abbildung 35: Interleukin-6-Antwort bei Stimulation der MC-CLPF und MCS-CLPF mit LPS und LPS plus steigender Konzentration von IL-33 .....	85
Abbildung 36: Interleukin-8-Antwort bei Stimulation der MC-CLPF und MCS-CLPF mit LPS und LPS plus steigender Konzentration von IL-33 .....	86

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Florian Obermeier für die Überlassung des sehr interessanten Themas und für die ausgezeichnete Betreuung bei den Versuchen und Unterstützung bei der schriftlichen Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Stefan Fichtner-Feigl danke ich recht herzlich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Für die Unterstützung bei den Arbeiten im Labor möchte ich mich besonders bei Frau Dr. rer. nat. Claudia Hofmann, Manuela Gunckel und Irina Fink bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Stefan Loose für die schöne und lustige Zeit im Labor bedanken.

Schließlich gebührt auch meinen Eltern Dank, die während der gesamten Zeit meines Studiums mir stets zur Seite standen und mich unterstützt haben.



